

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005170

International filing date: 22 March 2005 (22.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2005-029360
Filing date: 04 February 2005 (04.02.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 5 年 2 月 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 5 - 0 2 9 3 6 0

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 5 - 0 2 9 3 6 0

出 願 人
Applicant(s): チ ッ ソ 株 式 会 社
藤 森 工 業 株 式 会 社

2 0 0 5 年 4 月 1 3 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P-C50037
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K 14/745
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番16号 藤森工業株式会社
 本社内
 【氏名】 細川 和也
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番16号 藤森工業株式会社
 本社内
 【氏名】 鹿島 甲介
【特許出願人】
 【識別番号】 000002071
 【氏名又は名称】 チッソ株式会社
【特許出願人】
 【識別番号】 000224101
 【氏名又は名称】 藤森工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100100549
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 川口 嘉之
 【電話番号】 03-3669-6571
 【連絡先】 担当
【選任した代理人】
 【識別番号】 100090516
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 松倉 秀実
【選任した代理人】
 【識別番号】 100089244
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 遠山 勉
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004- 80950
 【出願日】 平成16年 3月19日
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004-170346
 【出願日】 平成16年 6月 8日
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004-217834
 【出願日】 平成16年 7月26日
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2004-315631
 【出願日】 平成16年10月29日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 192372
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【包括委任状番号】	9712150	

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

野生型トロンビンのアミノ酸を 1 個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの 100 万分の 1 以下であるトロンビン誘導体。

【請求項 2】

トロンビン基質結合能がアンヒドロトロンビンの 1 % 以上である請求項 1 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3】

ヒルジン C 末端ペプチド結合能を有する請求項 1 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4】

トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの 1 % 以上である請求項 1 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5】

ヘパリン結合能が野生型トロンビンと同程度である請求項 1 ～ 4 の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 6】

0.1 M の NaCl を含む pH 7.4 の 50 mM トリス塩酸中でトロンビン基質と 37℃ で 3 時間反応させたときに分解されるトロンビン基質の割合が 10 % 以下である請求項 1 ～ 5 の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 7】

トロンビン基質が血液凝固第 13 因子である請求項 6 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 8】

トロンビン基質がトロンビンレセプター細胞外ドメインのペプチドである請求項 6 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 9】

トロンビン基質がフィブリノゲンである請求項 6 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 10】

0.1 M の NaCl を含む pH 7.4 の 50 mM トリス塩酸に溶解した 1 mg/ml フィブリノゲン溶液に、終濃度が 0.1 mg/ml になるように加えて、37℃、3 時間インキュベーションしたときにフィブリンクロットを形成させない請求項 1 ～ 6 の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 11】

トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの 50 % 以下である請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 12】

抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの 50 % 以下である請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 13】

フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの 50 % 以下である請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 14】

抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの 50 % 以下である請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 15】

トロンビンレセプター又は血液凝固第 8 因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に 2 倍以上に高まった請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 16】

トロンビンレセプターまたは血液凝固第 8 因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に 2 倍以上に高まった請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 17】

野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 18】

ヒト野生型トロンビンが配列番号 2 のアミノ酸配列を含む蛋白質である請求項 17 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 19】

カルボキシル基が修飾された請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 20】

アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された請求項 19 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 21】

ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項 19
記載のトロンビン誘導体。

【請求項 22】

アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項 19
記載のトロンビン誘導体。

【請求項 23】

前記ポリエチレングリコールが分子量 1000 以下のポリエチレングリコールである、請求
項 21 または 22 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 24】

カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された請求項 19 に記載のトロンビン誘導
体。

【請求項 25】

一分子当たり少なくとも 3 個以上のカルボキシル基が修飾された請求項 19 ～ 24 のいず
れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 26】

一分子当たり 25 個以下のカルボキシル基が修飾された請求項 19 ～ 24 のいずれか一項
に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 27】

少なくとも B 鎖 25 番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された請求項 19 ～ 26
のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 28】

血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した請求項 19 ～ 27 のいずれか一項に記載のト
ロンビン誘導体。

【請求項 29】

血小板の GPIIb/IIIa 拮抗能を有する請求項 19 ～ 27 のいずれか一項に記載のトロンビン誘
導体。

【請求項 30】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B 鎖の 205 番目のセリン、203 番目のグ
リシン、43 番目のヒスチジン、および 99 番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくと
も 2 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 31】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B 鎖の 203 番目のグリシン、43 番目のヒ
スチジン、および 99 番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも 1 つのアミノ酸と、
B 鎖の 205 番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 3 2】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、グリシン、およびシステインのいずれかである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 3】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がグリシンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 4】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がアラニンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 5】

B鎖の203番目のグリシンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、およびセリンのいずれかである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 6】

B鎖の99番目のアスパラギン酸を置換するアミノ酸が、アスパラギンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 7】

B鎖の43番目のヒスチジンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはアスパラギンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 8】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、少なくともB鎖の203番目のグリシンとB鎖の205番目のセリン置換されたトロンビンであって、該205番目のセリンがグリシンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 3 9】

B鎖の203番目のグリシンがアラニンに置換された、請求項38に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4 0】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン及びB鎖の43番目のヒスチジンが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 4 1】

B鎖の205番目のセリンを置換する他のアミノ酸がグリシン、アラニン、スレオニン、システインのいずれかである、請求項40に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4 2】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリンがアラニンに置換され、B鎖の43番目のヒスチジンがアラニンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 4 3】

さらに、ナトリウム結合部位のアミノ酸が置換された、請求項30～42のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4 4】

ナトリウム結合部位のアミノ酸がB鎖の232番目又は234番目のアスパラギン酸である請求項43に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4 5】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である請求項30～44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4 6】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である請

求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4 7】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの 5 0 % 以下に低下した請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4 8】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの 5 0 % 以下に低下した請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4 9】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの 5 0 % 以下に低下した請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 0】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの 5 0 % 以下に低下した請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 1】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの 5 0 % 以下に低下した請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 2】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの 5 0 % 以下に低下した請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 3】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第 8 因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に 2 倍以上に高まった請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 4】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第 8 因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に 2 倍以上に高まった請求項 3 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 5】

置換されるアミノ酸が B 鎖の 7 7 番目のリシンである請求項 4 7 ～ 5 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 6】

B 鎖の 7 7 番目のリシンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはグルタミン酸である請求項 5 5 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 7】

置換されるアミノ酸が B 鎖の 24 番目のグルタミンである請求項 4 7 ～ 5 4 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 8】

野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、請求項 3 0 ～ 5 7 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5 9】

ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である請求項58に記載のトロンビン誘導体。

【請求項60】

カルボキシル基が修飾された請求項30～59のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項61】

アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された請求項60記載のトロンビン誘導体。

【請求項62】

ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項60記載のトロンビン誘導体。

【請求項63】

アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項60記載のトロンビン誘導体。

【請求項64】

前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、請求項62または63記載のトロンビン誘導体。

【請求項65】

カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された請求項60に記載のトロンビン誘導体。

【請求項66】

一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された請求項60～65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項67】

一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された請求項60～65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項68】

少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された請求項60～67のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項69】

血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した請求項60～68のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項70】

血小板のGPIIb α 拮抗能を有する請求項60～68のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項71】

請求項1～29のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体をコードするDNA。

【請求項72】

請求項30～59のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体をコードするDNA。

【請求項73】

請求項1～70のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体を含有する医薬組成物。

【請求項74】

抗血栓剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項75】

抗炎症剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項76】

血小板凝集抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項77】

血小板粘着抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項78】

内因系血液凝固抑制剤である請求項 7 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 7 9】

トロンビンレセプター活性化抑制剤である請求項 7 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 0】

抗血液凝固作用と抗血小板作用の両方を有する請求項 7 3 に記載の医薬組成物。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物、特に抗血栓剤、抗炎症剤に関する。

【背景技術】

【0002】

トロンピンは血小板凝集反応や炎症反応などを担う、トリプシンと非常に相同性の高いトリプシン様のセリンプロテアーゼである。例えば、非特許文献1には、トロンピンが、基質であるトロンピンレセプターを活性化することによって血小板凝集反応、血管内皮細胞活性化、炎症反応を起こすことが記載されている。

【0003】

トロンピンの生理的作用に関しては以下の様な報告がなされている。非特許文献2には、トロンピンの主だった血液凝固に関連する基質認識にエクソサイトⅠ領域が重要な働きをすることが記載されている。さらに、非特許文献3には、トロンピン基質蛋白質（以下トロンピン基質）結合能を有した不活性化トロンピンであるアンヒドロトロンピンが野生型トロンピン同様にエクソサイトⅠ結合性のトロンピン基質に高い結合能を持つこと、ベンズアミジン等の活性中心へ立体障害となる物質の添加によりその結合能が失われることが記載されている。また、非特許文献4には、トロンピンなどのセリンプロテアーゼは、活性中心にセリン、ヒスチジン、アスパラギン酸を有しており、この3アミノ酸のチャージリレーシステムによりプロテアーゼ活性が発現され、セリンプロテアーゼのミカエリス複合体から4面複合体への進展にはグリシン193（193はキモトリプシノゲンにおけるアミノ酸の位置、トロンピンではB鎖 203位のグリシンにあたる）が関与していることが記載されている。

【0004】

これらをもとに、抗血栓剤等の開発のために、様々なトロンピンの修飾・改変が試みられている。特許文献1には、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって、該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質（以下「反応抑制物質」と言うことがある）を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤が開示されている。さらに該文献には、このセリンプロテアーゼ抑制剤は、抗血栓剤（血栓形成抑制剤）として有効であることが記載されている。該文献には、該反応抑制物質の具体例として、セリンプロテアーゼであるトロンピンと、フェニルメチルスルフォニルフルオリド（以下「PMSF」と言うことがある）などの阻害剤とを反応させ、活性部位に存在するセリンをデヒドロアラニンに転換すること（以下「アンヒドロ化」と言うことがある）により、セリンプロテアーゼ活性が著しく低下したトロンビン誘導体（以下「AHT」と言うことがある）が開示されている。

【0005】

また、特許文献2には、アンヒドロトロンピンのカルボキシル基とイミドとを反応させ、アンヒドロトロンピンを化学的に修飾したアンヒドロトロンビン誘導体（以下「M-AHT」と言うことがある）が開示されている。M-AHTは、血液中に大量に存在するフィブリノゲンへの結合能が選択的に低いことから、AHTに較べて部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）延長効果が飛躍的に増加し高い抗血栓効果を有する。

【0006】

一方で、アミノ酸置換を有するトロンビン誘導体の研究も行われている。トロンピンの遺伝子組み換えによる活性中心の置換体はこれまで下記のように幾つかの検討がなされてきた。

【0007】

例えば、非特許文献5には活性中心セリンをアラニンに置換したトロンピンを作製し白血球への影響が述べられている。この誘導体の活性に関しては活性を失ったトロンピン組

み換え体と記載されている。また、非特許文献6には、トロンビンB鎖 203 グリシンをアラニンに置換したトロンビン、活性中心セリンをアラニン又はスレオニンに置換したトロンビン、活性中心ヒスチジンをアスパラギンに置換したトロンビン、活性中心アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビンが記載されている。この報告では、活性中心セリンをスレオニンに置換したトロンビン、活性中心ヒスチジンをアスパラギンに置換したトロンビン、活性中心アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビンは、野生型トロンビンに比較し数千から数万分の1に低下しているのに比較し、トロンビンB鎖203 グリシンをアラニンに置換したトロンビン及び活性中心セリンをアラニンに置換したトロンビンに関しては活性が完全に失われたと報告している。しかしながら、これら報告のアミノ酸置換誘導体は報告に記載されている測定法では検出不能なレベルのごく僅かなトロンビン基質分解活性が残存していること、あるいはトロンビン基質結合能が著しく低下していること、血中に多量に存在するフィブリノゲンに高い親和性を有する、などにより、抗血栓、抗炎症剤としての十分な機能を有していなかった。

【0008】

その他のトロンビン誘導体については、特許文献3、非特許文献7～9に開示されるように、遺伝子工学的にアミノ酸置換を導入することによって基質活性化能を有したまま抗血液凝固効果を持つようになったトロンビン誘導体が報告されている。これらに開示されるトロンビン誘導体はトロンボモジュリン特異性が保持または増強されており、且つフィブリノゲン分解能が著しく低下した誘導体であり、トロンボモジュリンに特異的に結合しプロテインCを活性化する事で抗血栓性を有する誘導体である。

特許文献4には、活性中心のアミノ酸が置換され、さらにヒルジンを中和する事で抗凝固を抑制するプロトロンビン誘導体が開示されている。

特許文献5、6には、活性中心セリンがアラニンに置換されたトロンビン、及び活性中心セリンがアラニンに、かつ活性中心アスパラギン酸がアスパラギンに置換されたトロンビンが、洗浄血小板懸濁液中においてトロンビンによるトロンビンレセプターへの刺激を抑制した事が記載されている。

しかしながら、これら報告のアミノ酸置換によって得られるトロンビン誘導体は血液中に多量に存在するフィブリノゲンと強い親和性を持つため、加えたトロンビン誘導体の殆どがフィブリノゲンに結合してしまい、抗トロンビンレセプター効果を得るために多量の投与が必要となり、血液中で抗トロンビンレセプター剤（抗血小板剤）として使用することは実質的には不可能であった。

【特許文献1】国際公開第01／03740号パンフレット

【特許文献2】国際公開第02／077031号パンフレット

【特許文献3】特表平09－509045号公報

【特許文献4】特表平11－507542号公報

【特許文献5】特表平6－508742号公報

【特許文献6】特開2003－159088号公報

【非特許文献1】J. Biol. Chem. 261(1986)15928-15933

【非特許文献2】日本血栓止血学会誌 第10巻 2, 3号(1999)

【非特許文献3】Biochemical J. (2001)354.309-313

【非特許文献4】ヴォート生化学 上巻 1996年 p331－340 東京化学同人

【非特許文献5】Experimental cell research 219, 650-656(1995)

【非特許文献6】Biochimica et Biophysica Acta 1451(1999) 173-186

【非特許文献7】J. Biol. Chem Vol. 275, 39827-39830

【非特許文献8】J. Biol. Chem Vol. 279, 26387-26394

【非特許文献9】J. Biol. Chem Vol. 277, 27581-27584

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

AHTやM-AHTのように化学的手法により得られたトロンビン誘導体は、抗血栓効果や抗炎症効果を有しているが、セリンプロテアーゼ活性にはばらつきがあり、AHTへ変換する際のアルカリ処理、再生処理等の多工程を必要とし、回収率も50から60%と十分ではないという改善すべき点があった。

また、M-AHTにおいても微量に存在する残存トロンビン活性が、その抗凝固能を低下させる問題点があった。

【0010】

また、従来トロンビンにおいて報告されている多くの配列において活性中心のトロンビン置換体を作成したところ、抗血栓、抗炎症剤としての十分な機能を有していなかった。理由として、これら報告の置換体は抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的なトロンビン基質分解活性を有する、あるいは置換による影響で主にエクソサイトIの構造変化にともないトロンビン基質結合能が著しく低下している等の問題が考えられた。例えばBiochimica et Biophysica Acta 1451(1999) 173-186の中で活性が完全に喪失したと報告されるB鎖203グリシンをアラニンに置換したトロンビンにおいても、本発明で定義される抗血栓、抗炎症剤として用いる目的においての実質的なトロンビン基質分解活性が残存していた。さらにB鎖203グリシン及び活性中心ヒスチジン及びアスパラギン酸の置換は活性をより低下させるものの、その組み合わせによってはエクソサイトIの構造変化を招きトロンビン基質結合能が損なわれる場合があった。

本発明は、基質分解活性を実質的に欠き、且つ血栓形成に重要なトロンビン基質に特異的に結合することにより、生体に投与した場合に実質的に抗血栓、抗炎症剤として使用可能なトロンビン誘導体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は前述の従来技術の問題点に鑑み鋭意研究を重ねた。その結果、トロンビンのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が、遺伝子組換え操作により置換されたトロンビンであり且つ抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的にトロンビン基質を分解しないレベルに活性が低下していれば、AHT同様のAPTT延長を主効果とした抗血栓症効果が得られる事を見出した。さらに本発明で測定される基質活性化能を完全に失っている誘導体であればインキュベーションに影響を受けることなく確実にAPTTが延長されること、さらに、血栓形成に重要なトロンビン基質に対しより特異的な結合能を有していれば、より確実にAHT以上の抗血栓、抗炎症効果が得られる事を見出した。

【0012】

また、トロンビンの活性中心の置換方法についてさらなる検討を行ったところ、トロンビン誘導体において活性中心セリンの置換はアラニン、スレオニン、グリシン、システインへの置換であればエクソサイトIの構造が保持されトロンビン基質結合能が保たれることを見出した。

さらに、B鎖の205番目のセリン（活性中心セリン）、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン（活性中心ヒスチジン）、および99番目のアスパラギン酸（活性中心アスパラギン酸）から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸を最適な組み合わせに置換することにより、エクソサイトIの構造及びトロンビン基質結合能を保持し、且つ抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的なトロンビン基質分解活性を喪失した、抗血栓、抗炎症効果を持ったトロンビン誘導体が見出された。

上記置換の中でも、例えば、活性中心セリン及び活性中心ヒスチジンの置換により、トロンビン基質認識性が変化し、（主として血液凝固VIII因子特異性が向上（フィブリノゲン特異性が低下）する）、他の活性中心のアミノ酸を置換したトロンビン誘導体に比較して、低濃度においても主に血液凝固カスケード（特に部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT））特異的な抗血栓効果を発揮するトロンビン誘導体が見出された。

【0013】

本発明者はまた、上記誘導体のナトリウム結合領域を置換あるいは修飾することによってさらにトロンビン基質分解活性を低下させることができることを見出した。

さらに、上記アミノ酸置換以外のさらなる置換によって、血中に多量に存在するフィブリノゲンに対するトロンビン誘導体の親和性を、トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子に対し相対的に低下させることにより、トロンビン基質特異性がさらに限定され、より少ない投与量によって良好な抗血栓効果を得ることができることを見出した。

さらなるアミノ酸置換によって得られるトロンビン誘導体の中でも、高いAPTT延長効果を持つが抗血小板機能は低いタイプ、及び高いAPTT延長効果と高い抗血小板効果（但しPAR1阻害効果のみ）を示すタイプ等の種々の特徴を有した誘導体を作製できることを見出した。

さらに、上記アミノ酸置換に加え、トロンビン誘導体を持つ抗血栓性を損なうことなく、トロンビン誘導体のトロンボモジュリン親和性を特異的に低下させることで、生体投与されたトロンビン誘導体が血管内皮細胞上でトロンボモジュリンに結合し、本来生体内で起こるトロンビンによるトロンボモジュリン上におけるプロテインCの活性化を抑制することを防ぐことができ、より有効な抗血栓剤として機能しうる事を見出した。

また、国際公開第02/077031号パンフレット記載のカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンの効果が主にAPTT延長効果が主体であったのに対し、上記遺伝子組み換えによって得られた種々のトロンビン誘導体を、さらに国際公開第02/077031号パンフレット記載のカルボキシル基修飾方法を用いて一定範囲の個数の修飾を行った誘導体は、その活性中心及びその他のアミノ酸の置換、及び変異体の配列の組み合わせに依存し、APTT延長及び抗血小板効果のバランスを選択しうる様々な特徴の抗血栓効果を有する事を見出した。さらに本発明の誘導体にカルボキシル基修飾を行うことでリストセチン惹起血小板凝集（血小板膜上のGP1b α とvWF（von-Willebrand factor）との相互作用による血小板凝集で、主に血小板粘着に関与する）抑制効果を有する事を見出した。

特に本発明の種々のアミノ酸置換型トロンビン誘導体をさらにカルボキシル基修飾することにより、非常に高いAPTT延長効果を持ち、且つ強い抗血小板効果（特にPAR1活性化及びリストセチン惹起血小板凝集抑制効果）を有する誘導体、中程度のAPTT延長効果を持ち、且つ強い抗血小板効果を有する誘導体などが得られ、アミノ酸置換とカルボキシル基修飾の組み合わせにより種々の血栓症に適応しうる抗血液凝固効果、抗血小板効果を持ったトロンビン誘導体を作製できることを見出した。

本発明者はこれらの知見に基づいて本発明を完成させた。

【0014】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

（1）野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下であるトロンビン誘導体。

（2）トロンビン基質結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である（1）のトロンビン誘導体。

（3）ヒルジンC末端ペプチド結合能を有する（1）のトロンビン誘導体。

（4）トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である（1）のトロンビン誘導体。

（5）ヘパリン結合能が野生型トロンビンと同程度である（1）～（4）の何れかのトロンビン誘導体。

（6）0.1MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸中でトロンビン基質と37℃で3時間反応させたときに分解されるトロンビン基質の割合が10%以下である（1）～（5）の何れかのトロンビン誘導体。

（7）トロンビン基質が血液凝固第13因子である（6）のトロンビン誘導体。

（8）トロンビン基質がトロンビンレセプター細胞外ドメインのペプチドである（6）のトロンビン誘導体。

（9）トロンビン基質がフィブリノゲンである（6）のトロンビン誘導体。

（10）0.1MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸に溶解した1mg/mlフィブリノゲン溶液に、終濃度が0.1mg/mlになるように加えて、37℃、3時間イン

キュベーションしたときにフィブリンクロットを形成させない（１）～（６）の何れかのトロンビン誘導体。

（１１）トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの５０％以下である（１）～（１０）のいずれかのトロンビン誘導体。

（１２）抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの５０％以下である（１）～（１０）のいずれかのトロンビン誘導体。

（１３）フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの５０％以下である（１）～（１０）のいずれかのトロンビン誘導体。

（１４）抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの５０％以下である（１）～（１０）のいずれかのトロンビン誘導体。

（１５）トロンビンレセプター又は血液凝固第８因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に２倍以上に高まった（１）～（１０）のいずれかのトロンビン誘導体。

（１６）トロンビンレセプターまたは血液凝固第８因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に２倍以上に高まった（１）～（１０）のいずれかのトロンビン誘導体。

（１７）野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、（１）～（１６）のいずれかのトロンビン誘導体。

（１８）ヒト野生型トロンビンが配列番号２のアミノ酸配列を含む蛋白質である（１７）のトロンビン誘導体。

（１９）カルボキシル基が修飾された（１）～（１８）のいずれかのトロンビン誘導体。

（２０）アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された（１９）のトロンビン誘導体。

（２１）ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された（１９）のトロンビン誘導体。

（２２）アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された（１９）のトロンビン誘導体。

（２３）前記ポリエチレングリコールが分子量１０００以下のポリエチレングリコールである、（２１）または（２２）のトロンビン誘導体。

（２４）カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された（１９）のトロンビン誘導体。

（２５）一分子当たり少なくとも３個以上のカルボキシル基が修飾された（１９）～（２４）のいずれかのトロンビン誘導体。

（２６）一分子当たり２５個以下のカルボキシル基が修飾された（２９）～（２４）のいずれかのトロンビン誘導体。

（２７）少なくともＢ鎖２５番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された（１９）～（２６）のいずれかのトロンビン誘導体。

（２８）血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した（１９）～（２７）のいずれかのトロンビン誘導体。

（２９）血小板のGPIIb α 拮抗能を有する（１９）～（２７）のいずれかのトロンビン誘導体。

（３０）野生型トロンビンのアミノ酸配列において、Ｂ鎖の２０５番目のセリン、２０３番目のグリシン、４３番目のヒスチジン、および９９番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも２つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

（３１）野生型トロンビンのアミノ酸配列において、Ｂ鎖の２０３番目のグリシン、４３番目のヒスチジン、および９９番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも１つのアミノ酸と、Ｂ鎖の２０５番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導

体。

(32) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、グリシン、およびシステインのいずれかである(30)または(31)のトロンビン誘導体。

(33) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がグリシンである(30)または(31)のトロンビン誘導体。

(34) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がアラニンである(30)または(31)のトロンビン誘導体。

(35) B鎖の203番目のグリシンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、およびセリンのいずれかである(30)または(31)のトロンビン誘導体。

(36) B鎖の99番目のアスパラギン酸を置換するアミノ酸が、アスパラギンである(30)または(31)のトロンビン誘導体。

(37) B鎖の43番目のヒスチジンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはアスパラギンである(30)または(31)のトロンビン誘導体。

(38) 野生型トロンビンのアミノ酸配列において、少なくともB鎖の203番目のグリシンとB鎖の205番目のセリン置換されたトロンビンであって、該205番目のセリンがグリシンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

(39) B鎖の203番目のグリシンがアラニンに置換された、(38)のトロンビン誘導体。

(40) 野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン及びB鎖の43番目のヒスチジンが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

(41) B鎖の205番目のセリンを置換する他のアミノ酸がグリシン、アラニン、スレオニン、システインのいずれかである、(40)のトロンビン誘導体。

(42) 野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリンがアラニンに置換され、B鎖の43番目のヒスチジンがアラニンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

(43) さらに、ナトリウム結合部位のアミノ酸が置換された、(30)～(42)のいずれかのトロンビン誘導体。

(44) ナトリウム結合部位のアミノ酸がB鎖の232番目又は234番目のアスパラギン酸である(43)のトロンビン誘導体。

(45) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(46) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(47) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(48) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(49) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(50) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミ

ノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(51) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(52) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(53) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(54) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった(30)～(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(55) 置換されるアミノ酸がB鎖の77番目のリシンである(47)～(54)のいずれかのトロンビン誘導体。

(56) B鎖の77番目のリシンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはグルタミン酸である(55)のトロンビン誘導体。

(57) 置換されるアミノ酸がB鎖の24番目のグルタミンである(47)～(54)のいずれかのトロンビン誘導体。

(58) 野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、(30)～(57)のいずれかのトロンビン誘導体。

(59) ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である(58)のトロンビン誘導体。

(60) カルボキシル基が修飾された(30)～(59)のいずれかのトロンビン誘導体。

(61) アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(62) ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(63) アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(64) 前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、(62)または(63)のトロンビン誘導体。

(65) カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(66) 一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された請求項60～65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

(67) 一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された請求項60～65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

(68) 少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された(60)～(67)のいずれかのトロンビン誘導体。

(69) 血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した(60)～(68)のいずれかのトロンビン誘導体。

(70) 血小板のGPIIb/IIIa拮抗能を有する(60)～(68)のいずれかのトロンビン誘導体。

(71) (1)～(29)のいずれかのトロンビン誘導体をコードするDNA。

- (72) (30)～(59)のいずれかのトロンビン誘導体をコードするDNA。
- (73) (1)～(70)のいずれかのトロンビン誘導体を含有する医薬組成物。
- (74) 抗血栓剤である(73)の医薬組成物。
- (75) 抗炎症剤である(73)の医薬組成物。
- (76) 血小板凝集抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (77) 血小板粘着抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (78) 内因系血液凝固抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (79) トロンビンレセプター活性化抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (80) 抗血液凝固作用と抗血小板作用の両方を有する(73)の医薬組成物。

【発明の効果】

【0015】

本発明のトロンビン誘導体は、従来の化学的手法により得られたトロンビン誘導体に比べて、より少ない使用量で安定な抗血栓効果を得ることが出来る。なぜならば、従来のAHTやM-AHTのように化学的手法により得られたものに比べ、得られるトロンビン誘導体個々のトロンビン基質分解活性やトロンビン基質結合能のばらつきが実質的に皆無であるからである。さらに、本発明のトロンビン誘導体は、AHTやM-AHTのようにトロンビンからアンヒドロ化、再生処理の多工程を経ずに高回収率で抗血栓、抗炎症作用をもった不活性化トロンビンを得ることができる。また、従来の変異体に比べても、トロンビン基質分解活性が低いため、より少ない使用量で安定な抗血栓効果を得ることが出来る。

また、活性中心及びその他のアミノ酸の置換を行うことにより、血中に多量に存在するトロンビン基質であるフィブリノゲンへの親和性を特異的に低下させることで、より低濃度で高い抗血栓効果を得ることができる。さらにアミノ酸の置換によりトロンボモジュリンとの親和性を特異的に低下させた誘導体は、生体内でのプロテインC活性化を阻害する事が抑制し、生体内においてAhtやM-Ahtと比較しより高い抗血栓効果を有する。

また、本発明のアミノ酸の置換を行ったトロンビン誘導体と国際公開第02/077031号パンフレットのカルボキシル基修飾の組み合わせによって、該文献記載のカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンとは異なる種々の特徴を持った各種血栓症に最適に適応した抗血栓効果を持ったトロンビン誘導体を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のトロンビン誘導体は、野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの活性よりも低下した誘導体である。ここで数個とは、2～20個、好ましくは2～10個、より好ましくは2～5個を意味する。なお、本発明のトロンビン誘導体は、トロンビン基質への結合能を保持していることが好ましい。

【0017】

ここで野生型トロンビンとしてはヒトの野生型トロンビンが好ましく、配列番号2のアミノ酸配列を含むトロンビンがより好ましい。この配列はヒト野生型トロンビンのA鎖及びB鎖を含む配列である。なお、生体内では、トロンビンは、プロトロンビン（トロンビン前駆体）がXa因子などのプロテアーゼによって切断され、A鎖（例えば配列番号2のアミノ酸番号1～49の領域）及びB鎖（例えば配列番号2のアミノ酸番号50～308の領域）がS-S結合によって架橋された立体構造を有している（血栓・止血・線溶 中外医学社 p164～167）。したがって、本発明におけるトロンビン誘導体は、生体内で前記構造をとることができるものであれば特に制限されず、A鎖及びB鎖の両鎖を含むトロンビンだけでなく、遺伝子組換えや化学合成などで別々に作製されたA鎖とB鎖が生体内に投与され、生体内で前記のA鎖及びB鎖がS-S結合によって架橋された立体構造をとるようになったものも含む。ここで、ヒトトロンビンにおいてはA鎖N末端の13アミノ酸残基は自己分解に切り離される。よってA鎖はヒトトロンビンにおいてはN末端から13アミノ酸残基

が切り離された配列でも良い。さらに、生体内で前記の立体構造をとることのできるプロトロンビンやプレトロンビンなどのトロンビン前駆体蛋白質も本発明のトロンビン誘導体に含まれる。

【0018】

本発明において、「トロンビン基質への結合能」とは、血液凝固第8因子やトロンビンレセプターなどのトロンビン基質やその一部のペプチドに対する結合能を意味する。トロンビン基質としては血液凝固第8因子及びトロンビンレセプターが血栓形成及び炎症作用の進行に非常に重要であり、実質的には血液凝固第8因子及びトロンビンレセプターのトロンビンによる活性化を抑制することで血栓形成及び炎症作用は充分抑制される。したがって、トロンビン基質としては血液凝固第8因子あるいはトロンビンレセプターのトロンビン結合領域を含むペプチドが好ましい。

本発明において、抗血栓作用とは、好ましくは、抗血小板、抗血液凝固の1次止血、2次止血を合わせた全体での抗血栓作用を意味する。本発明の抗血小板作用、及び抗血液凝固作用を有するトロンビン誘導体は、例えば、1次止血においては主にGPIIb/IIIa（血小板受容体糖タンパク質IIb/IIIa）及びトロンビンレセプターに作用することで血小板へのカルボキシル基修飾トロンビン、リストセチン及びずり応力等の刺激を抑制して血小板凝集及び粘着を抑制し、2次止血においては主に血液凝固第8因子の活性化を抑制してAPTT（部分活性化トロンボプラスチン時間）を特異的に延長する。

本発明では、抗血小板効果確認の中でカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制効果を用いて評価している。

カルボキシル基修飾トロンビンがPRP（多血小板血漿：platelet rich plasma）中において血小板凝集を惹起すること、及びその血小板凝集惹起は抗PAR1抗体（ATAP2 コスモバイオ社）によって完全に阻害されることから、カルボキシル基修飾トロンビンはPAR1を介して血小板を活性化すると考えられる。したがって、本発明で得られる誘導体のカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集を阻害する効果はPAR1活性化阻害効果に基づくと考えられる。

【0019】

また、「トロンビン基質への結合能」は、トロンビン基質に保存されている領域のアミノ酸配列を有するペプチド、又はトロンビン基質結合に重要と報告されているサイトに特異的に結合するペプチド、具体的には、ヒルジンC末端ペプチドなどに対する結合量を測定することによってスクリーニングしてもよい。トロンビンのエクソサイト1は多くの血栓形成、炎症作用を持ったトロンビン基質蛋白質への結合に最も重要な役割を果たす必須の領域として報告されている領域であるが（Journal of Biological Chemistry 1989 Vol 264 8692-8698）、ヒルジンC末端ペプチドはこのエクソサイト1に対し特異的に結合することが知られる（Journal of Biological Chemistry 1991 Vol 266 23633-23636）。特に、血小板活性化を通じて血栓形成に重要な働きを持つトロンビンレセプターはヒルジンC末端領域に高い相同性を持ち、エクソサイト1へ強固に結合する事が報告されている。よってヒルジンC末端ペプチドに対する結合能を失っているものはエクソサイト1の構造が破壊されトロンビンレセプターをはじめとする多くのトロンビン基質への結合能を失っているものと考えられる。ヒルジンC末端ペプチド（例えば、配列番号3）に対する結合能は、実施例に示すようにヒルジンカラムへのトロンビン誘導体の結合量を測定することによって行うことができる。本発明のトロンビン誘導体は、野生型トロンビン又はアンヒドロトロンビンの1%以上、好ましくは10%以上、より好ましくは80%以上のトロンビン基質結合能を保持していることが望ましい。ここで、アンヒドロトロンビンはトロンビンの活性中心セリンが脱水酸化されたトロンビンであって、具体的には、国際公開第01/03740号パンフレットの実施例1記載のアンヒドロトロンビンを例示することができる。

【0020】

一方、本発明のトロンビン誘導体は、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの活性よりも低下していることが好ましいが、この「トロンビン基質分解活性」は、フィブリ

ノゲン、血液凝固第13因子、トロンビンレセプターなどの生体基質やS2238（シグマ社より入手可）などの合成基質を用いて測定することができる。ただしトロンビン誘導体を化学修飾などにより本来トロンビンの持つ基質特異性を変化させている場合、トロンビン誘導体の特異性を残している基質を選択する必要がある。但しトロンビン誘導体と蛋白質基質の K_m より明らかに基質が高濃度で測定される場合には活性測定に基質特異性は影響は無いと考えられる。また、フィブリノゲン凝固活性を確認することによっても「トロンビン基質分解活性」を測定することが出来る。

【0021】

本発明のトロンビン誘導体の活性は、野生型トロンビンに比べてより一層低下したレベルである事が望ましい。具体的には100万分の1以下、さらに望ましくは1000万分の1以下に低下していることが望ましい。トロンビンの生理的条件下における蛋白質基質活性化における k_{cat} 値は約 100 sec^{-1} レベルにもなり、他多くの基質に対しても同等の k_{cat} 値を示す。ラット投与実験におけるアンヒドロトロンビン生体内薬効半減期は1時間以内であり、ヒトにおいても同等以上が予測され、1000万分の1以下であれば抗血栓、抗炎症効果を目的としてトロンビン誘導体を投与した際、数時間にわたって蛋白性のトロンビン基質と結合した場合にもトロンビン誘導体のトロンビン基質分解活性が問題となることがないと考えられる。

【0022】

ただし、実際には合成基質による活性測定は種々のプロテアーゼの影響を大きく受け、100万分の1のレベルの活性を正確に測定する事は難しく、正確な基質分解活性は、より好ましくはトロンビンの蛋白質基質に対する分解活性を測定した方がより微妙な分解活性を確認する事ができる。

より具体的には、本発明のトロンビン誘導体は、例えば、実施例で示すような生理的条件下、3時間、フィブリノゲン、血液凝固第13因子、トロンビンレセプター、プロテインCなどのトロンビン基質と混合し反応させた場合の該基質の分解が10%以下のものを挙げることができる。上記条件であれば生体への投与後、本誘導体が代謝されるまでの間の本誘導体によるトロンビン基質活性化は問題にならないと考えられる。なお、この活性測定方法を用いると、*Biochimica et Biophysica Acta* 1451(1999) 173-186において完全に活性を失っていると報告されているB鎖203番目グリシンをアラニンに置換した誘導体は基質蛋白質分解活性を明らかに有する等、本発明記載の抗血栓剤として用いるのに必要なレベルの活性低下のスクリーニングが可能となる。

本発明で得られるトロンビン誘導体は特表平09-509045、*J. Biol. Chem.* Vol. 275, 39827-39830, *J. Biol. Chem.* Vol. 279, 26387-26394, *J. Biol. Chem.* Vol. 277, 27581-27584, に開示されるトロンビン誘導体とは異なる抗血栓作用の機構を有する。

すなわち、これらの文献に開示されるトロンビン誘導体はトロンボモジュリン特異性が保持又は向上しており、優先的にプロテインCを活性化する事で抗血栓性を発揮する。これに対し、本発明のトロンビン誘導体はプロテインCを含むトロンビン基質の活性化能を有さない。また反対にトロンボモジュリン親和性もより低下している事が望ましい。本発明のトロンビン誘導体は、より特異的に、血栓形成に重要なトロンビン基質に対し、活性化すること無しに結合し、血液中に存在するトロンビンによるこれらトロンビン基質の活性化を抑制することによって抗血栓性を発揮する。反対に本発明のトロンビン誘導体は生体内のトロンビンのトロンボモジュリン結合を阻害しないことが望ましく、トロンボモジュリン親和性は低下している事が望ましい。

【0023】

本発明のトロンビン誘導体は、通常の遺伝子変異導入法によってトロンビンの変異体をコードするDNAを作製し、該DNAを哺乳動物細胞などで発現させることによって得られる変異体の中から基質分解活性が低下し、かつ、ヒルジン及びトロンビン基質に対する結合能を保持しているものを選択することによって第一段階のスクリーニングをすることができる。

【0024】

本発明の1個又は数個のアミノ酸を置換して得られるトロンビン誘導体は、抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において、実質的にトロンビン基質分解活性を喪失しており、且つ基質結合能を野生型トロンビンと同等に保持していれば特に制限されるものではないが、具体的には、B鎖の205番目のセリン（B鎖205；配列番号2の254番目のセリンに相当するセリン）、203番目のグリシン（B鎖203；配列番号2の252番目のグリシンに相当するグリシン）、43番目のヒスチジン（B鎖43；配列番号2の92番目のヒスチジンに相当するヒスチジン）、および99番目のアスパラギン酸（B鎖99；配列番号2の148番目のアスパラギン酸に相当するアスパラギン酸）から選ばれた2つ以上のアミノ酸が置換されたトロンビン誘導体であることが好ましく、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた1つ以上のアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体がより好ましく、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジンのいずれか一方または両方のアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体が特に好ましい。

【0025】

活性中心であるB鎖205番目のセリンは、その置換によってエクソサイトIの構造が破壊されてトロンビン基質結合能が損なわれないようにするために、スレオニン、アラニン、グリシン、システインのいずれかに置換されていることが好ましく、アラニン、グリシンへの置換がより好ましい。B鎖203グリシンは、アラニン、セリン、スレオニンのいずれかに置換されている事が好ましい。B鎖99のアスパラギン酸は、アスパラギンに置換されていることが好ましい。B鎖43のヒスチジンは、アラニンまたはセリンまたはアスパラギンに置換されていることが好ましい。

【0026】

なお、本明細書中において、B鎖205、B鎖203等は、B鎖の1番目のアミノ酸（例えば、配列番号2のアミノ酸番号50のイソロイシン）から数えたアミノ酸番号を示している。なお、上記のような置換アミノ酸の位置はアミノ酸の欠失、挿入、付加などによって位置が前後することがある。例えば、N末端部に1つのアミノ酸残基が挿入されれば本来205番目のセリン残基は206番目となるが、そのような205番目のセリン残基に相当するセリン残基も、本発明においては205番目のセリン残基と呼ぶこととする。

【0027】

以下にアミノ酸の置換とそれによって得られる誘導体について説明する。
本発明のトロンビン誘導体は1)のステップ及び2)、3)の付加的ステップによって得られる。

- 1) 活性中心のアミノ酸の置換によって活性を喪失させ、且つ、エクソサイトI及びII等の重要部位の構造が保存された配列を選択し、好ましくはその中でも抗血栓効果の高い活性中心のアミノ酸置換の組み合わせを選択するステップ、
- 2) 活性中心以外のアミノ酸の置換によって1)で得られた基本となる誘導体の基質特異性を変化させ、1)の誘導体より高い抗血栓効果、トロンボモジュリンへの親和性の特異的な低下 等の特徴を付加させるステップ、
- 3) 1) または 2) のトロンビン誘導体のカルボキシル基を修飾することで、さらに高い抗血栓作用を有する誘導体、抗血栓作用の中でも内因系凝固、トロンビンレセプターの活性化による血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集（血小板粘着）に対し種々の強さで抑制しうる誘導体を作製するステップ。

以下、アミノ酸の置換の影響、意味合いを理解しやすくする為、活性中心のアミノ酸の置換、活性中心以外のアミノ酸の置換に分けて説明する。

【0028】

活性中心アミノ酸の置換について

B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸のうち、置換される2つ以上のアミノ酸の組合せは特に制限されるものではないが、置換を受ける2つ以上のアミノ酸（置換部位）の組合せ、さらには、

置換相手となるアミノ酸の種類により、基質結合能や抗血栓効果に違いがあることがある。一例として、下記トロンビン誘導体1～5を挙げて説明する。

【0029】

トロンビン誘導体1：置換部位がB鎖205番目のセリンと99番目のアスパラギン酸であり、セリンをアラニンに置換し、アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体（配列番号22のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体2：置換部位がB鎖205番目のセリンと43番目のヒスチジンであり、セリンをアラニンに置換し、ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン誘導体（配列番号26のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体3：置換部位がB鎖205番目のセリンと203番目のグリシンであり、セリンをグリシンに置換し、グリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体（配列番号8のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体4：置換部位がB鎖205番目のセリンと203番目のグリシンであり、セリンおよびグリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体（配列番号24のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体5：置換部位がB鎖205番目のセリン、203番目のグリシン、および99番目のアスパラギン酸であり、セリンおよびグリシンをアラニンに置換し、アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体（配列番号14のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体6：置換部位がB鎖205番目のセリン、43番目のヒスチジンであり、セリンをグリシンに置換し、ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン誘導体（配列番号34のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体7：置換部位がB鎖205番目のセリン、43番目のヒスチジンであり、セリンをアラニンに置換し、ヒスチジンをセリンに置換したトロンビン誘導体（配列番号36のアミノ酸番号44～351の配列）。

【0030】

トロンビン誘導体1～5は何れも、ヒルジゲルへの結合能を保持していたが、トロンビン誘導体4および5は、野生型トロンビンに比べ、ヘパリンゲルへの結合能が低下していた。

【0031】

トロンビン誘導体1～5は何れもAPTT延長を主とした抗血栓効果を有するものであるが、その効果の序列は下記の通りであった。

「トロンビン誘導体2>トロンビン誘導体1、3>>トロンビン誘導体4、5」
特に、トロンビン誘導体2は、後述のようなカルボキシル基修飾の有無に関わらず非常に高い抗血栓効果がみられた。また、トロンビン誘導体2にみられる抗血栓効果は、凝固カスケードに対し特異的に作用するものであり、特にAPTTを良く延長した。さらに、トロンビン誘導体2のカルボキシル基を修飾したトロンビン誘導体における抗血栓効果は、いずれも強い、凝固カスケード、血小板凝集、および血小板粘着抑制作用によってもたらされるものであった。

トロンビン誘導体2および4は、共に205番目のセリンをアラニンに置換したものであるが、前述のようにその抗血栓効果には大きな違いが見られた。トロンビン誘導体3および4も、共に203番目のグリシンをアラニンに置換したものであるが、やはりその抗血栓作用には前述のような違いが見られた。

トロンビン誘導体1、3はそのままではそれほど強い抗血栓性は有さないが、後述のような化学修飾によって基質特異性を変化させるか、又はアミノ酸（例えばB鎖77番目のリシン）を置換しフィブリノゲンへの親和性を特異的に低下させ、相対的に血液凝固第8因子に対する特異性を向上させる事によって、強いAPTT延長抑制効果又は血小板凝集抑制効果の一方又は両方を有するトロンビン誘導体を得られる。具体的には、化学修飾の場合はAPTT延長と抗血小板効果（凝集と粘着）が得られ、77番目のアミノ酸置換の場合はAPTT延長効果のみが得られる。

一方、トロンビン誘導体4，5においてはカルボキシル基の化学修飾を行った場合でも、また77番目のリシンを置換し遺伝子工学的に特異性を変化させてもあまり強い抗血栓能は得られなかった。

誘導体6，7は誘導体2同様に近い抗血栓能を示した。

【0032】

以上より、トロンビン活性中心の置換によって得られるトロンビン誘導体は、以下の様に分類される。ただし、以下の分類はあくまでも一例であり、本発明のトロンビン誘導体はこの外の分類に分類されるトロンビン誘導体であってもよい。

A) 活性中心セリン及び活性中心ヒスチジンを同時に置換することによって得られる、カルボキシル基修飾及びフィブリノゲンへの親和性を低下させる分子表面のアミノ酸の置換無しで強いAPTT延長効果を主とした抗血栓能を有するタイプ。

B) 活性中心セリン及び活性に関与する他のアミノ酸1つを同時に置換することによって得られるトロンビン誘導体であり、そのままではそれほど強い抗血栓能を持たないが、カルボキシル基修飾及び／又はフィブリノゲン親和性を低下させるさらなるアミノ酸の置換によって高い抗血栓能が現われるタイプ。

C) 活性中心セリンのみ／又は活性に関与する他のアミノ酸1つを同時に置換することによって得られるトロンビン誘導体でありカルボキシル基修飾及び／又はフィブリノゲン親和性を低下させるアミノ酸の置換によっても高い抗血栓能は現われないタイプ。

D) 抗血栓能を有しているものも残存活性を有しているため、抗血栓剤としては使用できないタイプ。

A)のグループに関してフィブリノゲン、血液凝固第8因子(FVIII)に対する基質特異性を確認したところ、活性中心のセリン、ヒスチジンを置換したグループはいずれも血液凝固第8因子特異性が向上していることが分かった。よって高いAPTT延長効果は活性中心のアミノ酸の置換の組み合わせによって基質分解活性が喪失されるとともに血液凝固第8因子特異性が向上(フィブリノゲン特異性が低下)したことに起因すると考えられる。本グループの誘導体は化学修飾無しに、そのフィブリノゲン親和性の低下により弱い抗血小板効果も確認された。また、その効果はPAR1活性化抑制効果であり、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果は有さない特徴を有していた。

【0033】

トロンビンの立体構造を勘案すると活性中心と、ヒルジンC末端ペプチド、ヘパリンのそれぞれの結合部位であるエクソサイトI及びIIは立体構造上距離が離れている。即ち、上記で例示された活性中心の置換の組み合わせにより、ヘパリン親和性が低下したグループ及び実施例で記載されている活性中心のアミノ酸の置換によってヒルジンC末端ペプチドゲルへの親和性が低下した誘導体は、活性中心のアミノ酸の無理な(構造上負荷のかかる)置換によって分子全体のフォールディング異常、構造に異常が起こったと考えられる。その為、基質親和性の低下が起こり抗血栓能の低下が起こったと推測される。

【0034】

上記記載の活性中心の置換で基質親和性を有し抗血栓能を有した配列(構造の正常な配列)に対しさらに抗血栓能を向上させる目的でエクソサイトI及びII領域上のアミノ酸のさらなる置換を組み合わせた誘導体の説明を以下に行う。このさらなるアミノ酸の置換によってヘパリン、ヒルジンゲルへの親和性が低下する場合も存在するが、これは結合領域への直接的なアミノ酸の変異の結果であり、活性中心のアミノ酸の置換での蛋白全体の構造異常に基づく親和性の低下とは異なるものである。

【0035】

活性中心以外のアミノ酸の置換を述べる。

本発明のトロンビン誘導体は、上記置換に加えて、活性中心に関与するアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸のさらなる置換によってトロンボモジュリン及び／またはフィブリノゲンへの結合能を特異的に低下した誘導体であることが好ましい。ここで、活性中心のアミノ酸としては、B鎖の205番目のセリン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸などが挙げられる。このような誘導体のトロンボモ

ジュリン及び／またはフィブリノゲン結合能は野生型トロンビンの50%以下に低下していることが好ましい。トロンボモジュリン結合能を選択的に低下させることで、本発明のトロンビン誘導体が生体内に投与された場合にトロンボモジュリンに結合し、本来生体内で機能するべきトロンビンのプロテインC活性化を抑制することを防ぐことができる。このようなトロンビン誘導体は、少なくとも抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれかを保持するものが好ましい。

トロンピンは、生体内ではトロンピンレセプター、血液凝固第8因子、トロンボモジュリン及びフィブリノゲンなどへの結合能を有しているが、上記トロンビン誘導体は、トロンピンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に高まる事で抗血栓効果が有意に高まったトロンビン誘導体、またはトロンピンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に高まったトロンビン誘導体であることが好ましい。なお、「相対的に高まった」とは、例えば、アミノ酸の置換により、置換前に比較し、誘導体の、トロンピンレセプター又は血液凝固第8因子に対する結合定数、又はIAsys等での結合容量と、トロンボモジュリンやフィブリノゲンに対する結合定数もしくは結合量の比が高まったことをいう。

【0036】

トロンボモジュリン及び／またはフィブリノゲンへの結合能を特異的に低下させる置換は特に限定されるものではないが、B鎖77番目のリシン（B鎖77；配列番号2の126番目のリシンに相当するリシン）又はB鎖24番目のグルタミン（B鎖24；配列番号2の73番目のグルタミン）、B鎖65番目のリシン（配列番号2の114番目のリシンに相当するリシン）等があげられる。B鎖77リシン及びB鎖24グルタミン、B鎖65リシンを置換するアミノ酸は特に限定されるものではないが、アラニン、セリン、スレオニン、グルタミン酸またはグルタミンであることが好ましい。

以下に例をあげると、活性中心203グリシンをアラニンに活性中心205セリンをグリシンに置換したトロンピンは殆どAPTT延長効果を示さなかった。しかしながら、さらに本誘導体にB鎖77リシンのグルタミン酸への置換を組み合わせた誘導体（配列番号28のアミノ酸番号44～351の配列）は、血液凝固第8因子特異性がフィブリノゲン特異性に対し相対的に向上し且つ高いAPTT延長効果を有した。

また、活性中心セリンをアラニンに、かつ活性中心ヒスチジンをアラニンに置換したトロンピンは高いAPTT延長効果を示した。この誘導体にさらに、B鎖77リシンのグルタミン酸又はアラニンへの置換を導入することでさらに、さらに強いAPTT延長抑制効果を有した（配列番号38または44のアミノ酸番号44～351の配列）。すなわち活性中心の置換による特異性の変化とさらに分子表面のアミノ酸置換による特異性の変化が相乗効果となって薬効の強さに影響する事がわかる。

また、活性中心セリンをアラニンに、かつヒスチジンをアラニンに置換し、さらにB鎖24番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した誘導体（配列番号40のアミノ酸番号44～351の配列）は、APTT延長効果を有し且つ、TM（トロンボモジュリン）結合能が著しく低下していた。

活性中心セリンをアラニンに、かつヒスチジンをアラニンに置換し、さらにB鎖65番目のリシンをアラニンに置換した誘導体（配列番号46のアミノ酸番号44～351の配列）は、APTT延長効果が増幅し、更にトロンボモジュリン親和性が低下するという2重の効果がみられた。

このように活性中心のアミノ酸の置換に加えてトロンピン分子表面の各蛋白質への相互作用部位を置換することで種々の特徴を有したトロンピン誘導体を得られる。

本発明で得られるトロンビン誘導体はプロトロンビン体にて生体内に投与されることも可能である。その場合、血栓部位にて抗血栓効果を持ったトロンピンに活性化を受け、血栓形成箇所にて抗血栓効果を発揮し、生体内にてより部位特異的な抗血栓効果が得られる。

【0037】

本発明のトロンビン誘導体は、上記置換に加えて、さらに、ナトリウム結合部位が置換されたトロンビン誘導体であってもよい。ナトリウム結合部位とはBiochemistry 1992年、

31巻, p11721-11730に開示された部位をいう。この中ではB鎖232又はB鎖234のアスパラギン酸（配列番号2の281又は283番目のアスパラギン酸に相当するアスパラギン酸）が好ましい。これらのアスパラギン酸は両方が置換されてもよい。また、これらのアスパラギン酸は、アラニンもしくはアスパラギンに置換されることが好ましい。

【0038】

本発明のトロンビン誘導体は、ヒルジンC末端ペプチドへの結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である限りにおいて、上述した置換されるアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されたアミノ酸配列を有する誘導体であってもよい。なお、ここで数個とは、2～20個、好ましくは2～10個、より好ましくは2～5個を意味する。また、ヒルジンC末端ペプチドへの結合能が野生型トロンビンの1%以上、かつトロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である限りにおいて、配列番号2のアミノ酸配列と全体として一定以上の相同性、すなわち、80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有する範囲で改変されたものであってもよい。

【0039】

上記のようなトロンビン誘導体は部位特異的変異導入法により各誘導体をコードするDNAを作製し、該DNAを哺乳動物細胞などで発現させることによって得られる。このようなDNAは上述したようにA鎖及びB鎖の両方をコードするものであってもよいし、各鎖をそれぞれ発現させてもよい。部位特異的変異導入法は特に限定されるものではないが、例えば、市販のQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit（ストラタジーン社製）などを用いて行っても良い。また、化学合成によってトロンビン誘導体を得ることもできる。

【0040】

本発明のトロンピンはさらに、上記の誘導体のカルボキシル基が修飾されたものであってもよい。この場合、カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾されたものが好ましい。カルボキシル基が修飾されることによって、フィブリノゲンに対する結合能が低下するため、トロンピンレセプターなどの基質に対する選択性が増し、より少量で抗血栓効果を達成することができる。

さらに上記カルボキシル基修飾によりリストセチン惹起血小板凝集（GPIIb α とvWFの相互作用による）を抑制する効果が加わる。

トロンビン誘導体のカルボキシル基の修飾は、例えば、国際公開02/077031号パンフレットに記載の方法に基いて行うことができる。

【0041】

また、上記誘導体をアミノ基を有する化合物を用いてカルボキシル基修飾してもよい。アミノ基を有する化合物は特に制限されないが、アミノ酸のエステル、側鎖にアミノ基を有するポリエチレングリコールなどが好ましい。アミノ酸のエステルとしてはグリシンエチルエステルなどが挙げられる。アミノ基を有する化合物を用いる修飾も国際公開02/077031号パンフレットに記載の方法に基いて行うことができる。一方、上記誘導体をポリエチレングリコールと反応させることによって、カルボキシル基を修飾してもよい。なお、ポリエチレングリコールまたはアミノ基を有するポリエチレングリコールを用いる場合、ポリエチレングリコール部分の分子量は1000以下であることが好ましい。

【0042】

抗血栓効果を特異的に上げるためにトロンビン表面のアミノ酸の置換を行った場合に得られる効果、及びさらにカルボキシル基修飾を組合わせた場合に得られる効果は、置換するアミノ酸の組み合わせなどによって大きく異なり、疾患及び病態などに応じて、また目的に応じてアミノ酸置換のみを導入したトロンビン誘導体または化学修飾を組合わせたトロンビン誘導体を用いることができる。

即ち、深部静脈血栓症等の静脈における血栓症においては血液凝固を抑制する薬が一般に用いられるため、各トロンビン誘導体及びそのカルボキシル基修飾体の中から高いAPTT延長効果を持つトロンビン誘導体を用いることが望ましい。

一方、心筋梗塞、不安定狭心症等の動脈系の血栓症においては血小板凝集を抑制する薬が一般に用いられるため、高い血小板凝集抑制効果を持ったトロンビン誘導体が望まれる。その中よりAPTT延長効果の異なるトロンビン誘導体は出血など副作用の状況等に応じて選択がなされるべきである。

また、動脈硬化部位におけるブラークの破綻にともなう、血栓症においては血小板と共に凝固系の抑制も重要であることが報告されており（血栓症、南江堂）血小板、凝固双方の抑制が効果的である。このような凝固、血小板両方に作用する薬剤は現在市販されておらず、本発明により全く新たな治療剤を提供しうる。

【0043】

以下にトロンビン誘導体の活性中心のアミノ酸置換とそのカルボキシル基修飾との関係について一例を挙げて説明する。以下の説明は水溶性カルボジイミドを縮合剤として用い、且つ修飾をグリシンエチルエステルによって行い約15個のカルボキシル基が修飾された誘導体である。

修飾体1：B鎖205セリンをアラニンに、かつB鎖43ヒスチジンをアラニンに置換した誘導体は、カルボキシル基の修飾を行わずとも、非常に高いAPTT延長効果を有している。本配列のトロンビン誘導体はカルボキシル基修飾を行った場合APTT延長効果の増幅もある程度えられるが、それ以上にカルボキシル基修飾を行った本配列のトロンビン誘導体は血小板に対するリストセチン凝集抑制効果、カルボキシル基修飾トロンビン（M-トロンビン）凝集抑制効果が大きく高まり、結果、抗血液凝固、抗血小板能共に非常に高い効果をもった誘導体が得られた。

修飾体2：B鎖205セリンをグリシンに、B鎖203番目のグリシンをアラニンに置換した誘導体は、化学修飾前にはAPTT延長効果、抗血小板効果は弱いものであるが、カルボキシル基修飾を行うことで、APTT延長効果、抗血栓効果が高まり中程度のAPTT抑制効果と高い抗血小板効果を持ち合わせたトロンビン誘導体を得られた。

修飾体3：B鎖205セリンをアラニンに、B鎖203番目のグリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体はAPTT延長効果をほとんど示さなかった。このトロンビン誘導体のカルボキシル基を修飾した場合にもAPTT延長効果の増幅は顕著には見られなかった。

修飾体4：B鎖205セリンをグリシンに、B鎖203グリシンをアラニンに、B鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン誘導体はAPTT延長効果を持つが、抗血小板効果は非常に弱いものである。このトロンビン誘導体のカルボキシル基修飾を行った場合にはAPTT延長効果のさらなる増加は殆ど見られないが、抗血小板効果は顕著に増幅された。但し修飾による回収率は50%以下であり著しく低下した。

修飾体5：205セリンをアラニンに置換した誘導体は比較的弱いAPTT延長効果を持つが抗血小板効果は非常に弱いものであった。このトロンビン誘導体にカルボキシル基修飾を行った場合にはAPTT延長効果の大幅な増幅は見られないが、抗血小板効果は（PAR1及びリストセチン両方の経路に対し）顕著に増幅された。

修飾体6：B鎖205セリンをアラニンに、B鎖43ヒスチジンをアラニンに、B鎖65リシンをアラニンに置換した誘導体は強いAPTT延長効果と共に強いPAR1経路の血小板凝集抑制効果を有していた。一方、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果は有していなかった。このトロンビン誘導体にカルボキシル基修飾を行った場合はAPTT延長効果が若干増強し、M-トロンビン惹起血小板凝集効果にはそれほど大きな違いは確認されなかったが、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果が新たに付与された。また、修飾体4にみられた回収率の大きな低下はおきなかった。

【0044】

即ち前述の第一段階での遺伝子工学的に得られるトロンビン誘導体の中から、A)活性中心におけるアミノ酸の置換の組み合わせにより抗血栓性の増したタイプ、B)さらなるアミノ酸の置換により、フィブリノゲンへの親和性を低下させて基質特異性を変化することによって抗血栓性が増したタイプ、C)さらなるアミノ酸の置換によってA)B)のトロンビン誘導体のトロンボモジュリン親和性が低下したタイプ、D) A)B)C)それぞれのトロンビン誘導体のカルボキシル基を修飾する事で最終的にAPTT延長効果、PAR1、GPIIb α （粘着、ず

り応力惹起血小板凝集) 効果が種々のバランスで組み合わせられた種々の抗血栓効果を持ったタイプのトロンビン誘導体を選択することができる。

また、GPIIb α のみ抑制する誘導体の場合は活性中心が閉塞する事によって活性及び基質親和性が低下したPPACK-トロンビン (Phe-Pro-Arg配列がクロロメチルケトン修飾されたもの) を修飾した誘導体を用いることが出来る。但しその場合も本明細書記載のトロンボモジュリンに対し親和性を低下させる置換を分子表面に施すことによりより有効な効果を発揮する。

【0045】

本発明の各種トロンビン誘導体は、目的によって使い分ける事が可能である。例えば、トロンビン誘導体2は静脈内におけるフィブリン血栓(赤色血栓)に対し効果的である事が予測され、トロンビン誘導体2のカルボキシル基修飾体は、動脈内の血小板血栓(白色血栓)に対しても効果的である事が予想される。

あるいは化学修飾を行わない前述の活性中心セリンがアラニンに、活性中心ヒスチジンがアラニンに、かつB鎖77リシンがグルタミン酸に置換されたトロンビンも静脈内血栓に関しては有効と考えられる。

又、動脈内での血小板血栓においてもその疾患において出血が問題になる場合には、トロンビン誘導体2のカルボキシル基修飾体よりもAPTT延長効果の低いトロンビン誘導体3のカルボキシル基修飾体の方が望ましい。これらは疾患の患者に対するリスクと出血のリスクを考慮して選択することができる。

上記に記載されるヘパリン結合能の低下に関して、そのヘパリン結合能の低下がヘパリン結合領域(エクソサイトII等)以外の領域、例えば活性中心のアミノ酸の置換によって引き起こされる場合、その置換によってトロンビン変異体全体の分子構造に歪む等の悪影響が与えられ、ヘパリン結合能が低下したと推察される。

実際に生体内に投与する場合、活性中心を本発明で開示されるような最適な組み合わせで変異させた上で、目的に応じ、さらなる組換え体として積極的にエクソサイトIIに位置するアミノ酸(例えばB鎖98番目のアルギニン、B鎖245番目アルギニン、B鎖248番目リジンをアラニン等の他のアミノ酸)に置換する事によってヘパリン親和性を低下させたトロンビン誘導体を得ることも可能である。ヘパリン親和性を低下させた誘導体を用いることで血管内皮細胞上のヘパラン硫酸等への親和性が低下し血中循環量の向上が期待される。

【0046】

なお、カルボキシル基修飾を行う場合、カルボキシル基修飾によって付加される効果はその修飾個数によっても大きく影響を受ける。

トロンビンのカルボキシル基修飾による上記各誘導体が修飾体1から5に記載される所望の効果をを得るためには3個以上のカルボキシル基が修飾される事が望ましい。3個以下では前記カルボキシル基修飾によって付加される効果は著しく低下する。同様にカルボキシル基修飾は25個以下であることが望ましい。25個を超えた場合にも前記カルボキシル基修飾による効果は著しく低下すると共に 修飾による回収率の著しい低下が起こる。但しトロンビン誘導体表面にアミノ酸置換によってカルボキシル基を導入、削除して得られるトロンビン誘導体に関しては、その置換によるカルボキシル基の増加、減少は除いて考える。

さらに修飾個数によって多様な効果を持った誘導体を得られる。例えば前述の修飾体1)の修飾個数を8又は5個と減らす事で非常に高いAPTT延長効果と中から低度の抗血小板効果を持った誘導体を得られる。

カルボキシル基を修飾する場合、少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾されたものであることが好ましい。本発明のカルボキシル基が修飾されたトロンビン誘導体は、血小板のリストセチン凝集抑制能が向上された誘導体及び/または血小板のGPIIb α 拮抗能を有する誘導体であることが好ましい。

【0047】

本発明はまた、上述したようなトロンビン誘導体をコードするDNAを提供する。この

ようなDNAとしては、例えば、配列番号7、13、21、23、25、27、33、35、37または39の塩基番号130～1056の塩基配列を含むDNAなどを例示することができる。また、上述したようなトロンビン誘導体をコードする限りにおいて、配列番号7の塩基番号130～1056の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものであってもよい。ここで、ストリンジェントな条件としては、例えば、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度で、1回より好ましくは2～3回洗浄する条件が挙げられる。

【0048】

本発明のトロンビン誘導体は抗血栓作用を有している。この作用は、例えば、実施例に示すような血漿の部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）測定や全血凝固時間測定、血小板凝集能抑制効果によって確認することができる。

本発明のトロンビン誘導体を製剤学的に許容される製剤担体と組合わせることにより、医薬組成物として使用することができる。ここで、医薬組成物として好ましくは、抗血栓治療薬、抗炎症剤、血小板凝集抑制剤、血小板粘着抑制剤、血小板GPIIb/IIIa拮抗剤、トロンビンレセプター活性化抑制剤などを挙げることができる。上記製剤担体は製剤学的に許容されるものであれば特に制限されないが、通常の薬剤に汎用される注射剤用溶剤、安定剤、希釈剤、界面活性剤等を使用できる。本発明の医薬組成物の投与単位形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択できる。例えば、注射剤等を例示できる。本発明の医薬組成物の投与量は、症状などに応じて適宜選択される。

【実施例】

【0049】

以下実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はその趣旨を超えない限り、この実施例の範囲には限定されない。以下、血液凝固第8因子は、単にFVIIIと呼ぶこともある。また、血液凝固第13因子は、単にFXIIIと呼ぶこともある。

【0050】

<1>トロンビン基質分解活性の測定

方法A：合成基質S2238（シグマ社）を基質とし、50mMトリス塩酸（pH8）、37℃における405nmの吸光度の増加による測定を行った。

被験サンプル（ヒト野生型トロンビンまたはトロンビン誘導体）の50mMトリス塩酸0.1M NaCl溶液（pH7.4）、ヒト野生型トロンビンの場合の濃度は1μg/ml、トロンビン誘導体の場合の濃度は200μg/mlと、合成基質S2238の50mMトリス塩酸0.1M NaCl溶液（pH7.4）を、200μlずつエッペンチューブに加え、37℃、12時間インキュベーションした。反応停止は50%酢酸200μlを添加して行った。

なお、合成基質S2238の50mMトリス塩酸0.1M NaCl溶液（pH7.4）と、50mMトリス塩酸0.1M NaCl（pH7.4）を、200μlずつエッペンチューブに加え、37℃、12時間インキュベーションしたものをコントロールとした。

12時間インキュベーションした後のコントロールの吸光度は、インキュベーション前に比べて0.005増加した。被験サンプルの12時間インキュベーション終了後の吸光度の増加が、インキュベーション前の吸光度に比べて0.05以下の場合は測定限界以下であると判定した。

方法Aにおいて活性が認められないレベルに活性が低下したトロンビンに関しては、さらに以下の方法B又はC又はDいずれかの活性測定を行った。

【0051】

方法B：FXIIIとしてフィブロガミンP（アベンティスファーマ）を用いた。3mlのフィブロガミンP250単位を50mMEDTA、0.1M NaCl（pH7.4）に透析した溶液50μlに対し、被験サンプル0.1mg/ml（トロンビン誘導体）のPBS溶液（pH7.4）100μlをエッペンチューブに加え、37℃、3時間インキュベーションした後、SDS-PAGEによってFXIIIの活性化の有無を確認した。目視で分解産物が確認される場合にSDSPAGEを—SH条件下で行いFXIIIのA鎖及び活性化A鎖のバンドの濃さをライトキャプチャー（アトー株式会社）

を用い解析比較した。

【0052】

方法C: 50mM トリス塩酸 0.1M NaCl (pH7.4) に溶解した4mg/ml フィブリノゲン溶液 200 μ l に、0.2mg/ml に調整された被験サンプル (トロンビン誘導体) を 100 μ l 添加し良く混和したのち、37℃、3時間のインキュベーションを行った。3時間後のクロット形成の有無を目視によって判断した。

【0053】

方法D: 50mM トリス塩酸 0.1M NaCl pH7.4 に溶解した0.1mg/ml トロンビンレセプター細胞外ドメインペプチド (配列番号4) 溶液 200 μ l に、0.3mg/ml に調整された被験サンプル (トロンビン誘導体) を 100 μ l 添加し良く混和したのち、37℃ 3時間のインキュベーションを行った。50%酢酸 200 μ l を添加して反応を停止した後、SDS-PAGEによってトロンビンレセプターの活性化の有無を確認した。目視で分解産物が確認される場合にSDSPAGEを-SH条件下で行いトロンビンレセプターの分解産物のバンドの濃さをライトキャプチャー (アトー株式会社) を用い解析比較した。

【0054】

<2>基質結合能の測定法

方法E: ヒルジンC末端ペプチド (配列番号3) への結合性の確認

(1) ヒルジンC末端ペプチドゲルの作製

ヒルジンC末端ペプチド 10mg を0.1M NaHCO₃緩衝液に溶解し、同緩衝液に置換したNHS活性化セルロファイン (チッソ社) 10ml を加え混和し30分間 25℃にて攪拌した。

ここに1Mトリス塩酸 pH8 25℃ 20ml を加え更に30分間攪拌しヒルジンC末端ペプチド固定化ゲルを得た。同ゲルを50mM トリス塩酸 0.15M NaCl (pH7.4) 25℃で平衡化した後、0.1M NaHCO₃緩衝液で透析した各トロンビン誘導体を添加し 30ml の0.1M NaHCO₃緩衝液で洗浄した。

(2) ヒルジンC末端ペプチド (配列番号3) への結合性の確認 ヒト野生型トロンビンもしくはトロンビン誘導体を含有する分画の2ml を、50mMトリス塩酸 0.15M NaCl (pH8) 4℃に平衡化したヒルジンC末端ペプチドカラム 10ml に添加し、30ml の50mM トリス塩酸緩衝液で洗浄後、50mM トリス塩酸 1M NaCl 3M 尿素 (pH8) で溶出した。抗ヒトトロンビン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより素通り分画、および溶出分画のトロンビンを確認した。なお、本実験では50%以下の担体への結合の誘導体は基質結合能を喪失していると判断した。

【0055】

方法F: バイオセンサー (IA Sys 日製産業) を用いたトロンビン誘導体のトロンビンレセプター結合能の測定

(1) トロンビン誘導体固定化キュベットの作製

被験サンプル (トロンビン誘導体) 10mM リン酸バッファー (pH7.7) を、NHS活性化CMデキストランキュベット (日製産業社) 10分間 25℃で攪拌することにより、被験サンプル (トロンビン誘導体) をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、トロンビン誘導体固定化キュベットを得た。引き続き1M エタノールアミン (pH8) を0.2ml 加えブロッキング処理を行った。

(2) 約1000、500、200、100、50、25、10nM に調整した トロンビンレセプター細胞外ドメインペプチド (配列番号4) の50mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl 溶液 (pH7.4) 0.1ml を、(1) で得られたトロンビン誘導体固定化キュベットに加え結合曲線を解析した。解析はFAST fit (日製産業) を用い同社マニュアルに順じて行った。

【0056】

<3>APTT測定方法

本実施例において方法に関し特に指定が無い限り、APTTの測定は下記の方法にて行った。

標準血漿 (国際試薬社) とサンプルを混和し、総量の25%のAPTT試薬 (国際試薬社) を加え37℃ 5分インキュベーションを行う。5分後 0.1M CaCl₂ を8 μ Mになるよ

うに添加しカルシウム添加後 凝固までの時間を測定する。

【0057】

<4>アンヒドロトロンビンの合成

本実施例中のアンヒドロトロンピンは下記の実験方法によって得たものを使用した。

4-1: アンヒドロトロンピン (AhT) の合成

ヒトThrombin60mgを100 μ M PIPES pH6.5 50mlに溶解しAPMSF(WAKO社)10mgを加え10分攪拌した。つづいて溶解サンプルを氷水で冷却し、1N NaOHを6ml加え、10分間反応させた後(氷水中で反応)、5M NaCl 14mlとglycerol 70mlを加え攪拌し、1M PIPES(pH6.5)にてpH8.0へ調整した。さらに、0.1M NaHCO₃ - 0.5M NaCl 560ml中へ、調整サンプルを滴下希釈し、0.1M NaHCO₃ - 0.5M NaClにて透析を行った。引き続き透析サンプルを、8,000rpm 5min. 遠心沈殿除去後、サンプルを最終100mlへ濃縮した。

Anti-Thrombin(AT) 50単位/ml 1mlにHeparine 10mgを加えたものを濃縮後のサンプルに加え、50mM NaHCO₃ - 0.3M NaClに透析する。その後、8,000rpm 5min. 遠心沈殿除去した。

【0058】

4-2: AhTの精製

50mM NaHCO₃にて平衡化したBenzamidine-Separeose(50ml)にAで得られたサンプル50mlを添加し(流速2ml/min)、50mM NaHCO₃ - 0.1M NaClにて洗浄後、0.1M Benzamidine - 50mM NaHCO₃ - 0.1M NaClにて溶出した。BCAにて蛋白の確認をし、AhT蛋白の含まれる画分を、50mM NaHCO₃にて平衡化したHeparine-Separeoseに添加し(流速2ml/min)その後、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄し、benzamidine除去後、1mM PIPES - 1M NaCl pH6.5にてAhTを溶出させた。溶出画分に、APMSFを10mg添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5に透析した。

【0059】

4-3: 2回目ベンズアミジン精製

つづいて再度カラム添加直前に、サンプルにAPMSFを1mg加え、1mM PIPES pH6.5にて平衡化したBenzamidine-Separeoseカラムに添加した。1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄後、0.1M Benzamidine - 1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて溶出し、1mM PIPES pH6.5にて平衡化したHeparine-SepareoseにAhT画分を添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄後、1mM PIPES - 1M NaCl pH6.5にて溶出させた。

【0060】

4-4: 3回目ベンズアミジン精製

得られたサンプルにAPMSFを10mg添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて透析後、2回目ベンズアミジン精製同様の操作にてAhTを精製し、ヘパリン溶出AhTに再度1mgのAPMSFを添加した。約30mgのアンヒドロトロンピンが回収された。

【0061】

[実験例1]

(1) ヒト野生型トロンビンの発現

ヒト野生型トロンビンのA鎖及びB鎖を含むDNA(配列番号5)をベクターに挿入しCHO細胞にトランスフェクションし、プレトロンビン生産細胞を得た。プレトロンビン生産細胞をCD-CHO培地2リットルで10日間培養した。得られたプレトロンビン生産細胞の培養液2リットルを20リットルの10mM PIPES緩衝液(pH7)4℃に6時間ずつ2回透析したのち、CMセルロファイン(チッソ社)500mlに添加し、10mM PIPES緩衝液(pH7)1リットルにて洗浄した。次に、10mM PIPES緩衝液(pH7)0~1M NaClの直線的濃度勾配にて溶出を行った。溶出液を各25mlずつの分画に分け、それぞれを抗ヒトトロンビンポリクローナル抗体(コスモバイオ社)を用いたウェスタンブロッティングによって確認したところ、ヒト野生型トロンピンは約0.4Mで溶出された。

【0062】

(2) ヒト野生型トロンビンのエカリンによる活性化及び活性化ヒト野生型トロンビンのヒルジンC末端ペプチドカラム結合性の確認

得られたヒト野生型トロンピンを5 mg含む分画約100 mlを2リットルの50 mM トリス塩酸緩衝液、0.15 M NaCl、5 mM、CaCl₂ (pH8) 溶液に透析した後、エカリン (シグマ社) 100 unitsを加え、37℃ 24時間インキュベーションした。エカリン処理後の一部を用い方法E記載のヒルジンC末端結合実験を行ったところ、素通り分画にはトロンピンは確認できず、溶出分画にトロンピンのバンドが確認された。

【0063】

(3) ヒト野生型トロンピンの精製

次にヒルジンC末端結合実験に使用した残りのエカリン活性化後のトロンピンを含む溶液98 mlを、50 mM トリス塩酸緩衝液、0.1 M NaCl (pH8) で平衡化した硫酸化セルロファインカラム (チッソ社) 200 mlに添加し、同緩衝液200 mlで同カラムを洗浄した後、50 mM トリス塩酸緩衝液、1 M NaCl (pH8) にて溶出した。さらに溶出液を50 mM トリス塩酸緩衝液、0.1 M NaCl (pH8) に透析し、同緩衝液で平衡化されたヒルジンC末端ペプチドカラム (ヒルジンC末端ペプチドを200 mg、NHS活性化セルロファイン (チッソ社) を30 mlとした以外は、前述の「方法C: ヒルジン、(1) ヒルジンC末端ペプチドゲルの作製」に記載の方法に準じて作製した) 30 mlに添加した。50 mM トリス塩酸緩衝液150 mlで該ヒルジンC末端ペプチドカラムを洗浄した後、50 mM トリス塩酸緩衝液、1 M NaCl 1 M グアニジン塩酸 (pH8) にて溶出し、SDS-PAGE上ほぼ純化されたヒルジン結合性のヒト野生型トロンピン 約5 mgを得た。

【0064】

[実験例2]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをグリシンに置換したトロンピン (以下203A205Gトロンピン) の発現

203A205GトロンピンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203A205Gトロンピンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号7に示す。

203A205Gトロンピンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンピン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上でほぼ純化された203A205Gトロンピンが約5 mg得られた。

【0065】

(2) 203A205Gトロンピンの基質分解活性測定

(1) で得られた203A205Gトロンピンのトロンピン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の有意な増加はみられなかった。

さらに、203A205Gトロンピンのトロンピン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。さらに、203A205Gトロンピンのトロンピン基質分解活性を、前述の方法Cに従って測定した結果、クロット形成は確認されなかった。

【0066】

(3) 203A205Gトロンピンのトロンピンレセプターへの結合能の確認

(1) で得られた203A205Gトロンピンのトロンピンレセプターへの結合能を、前述の方法Fに従って測定した。203A205Gトロンピンのトロンピンレセプターの解離定数は $3.2 \mu\text{M}$ であった。

【0067】

(4) 203A205Gトロンピンの活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の測定

$50 \mu\text{g/ml}$ の203A205Gトロンピン (PBS; 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 8.1mM Na₂HP0₄, 1.47 mM KH₂P0₄ (pH7.4) を $100 \mu\text{l}$ を標準血漿 (国際試薬社) $100 \mu\text{l}$ と混合し、APTTを測定した。PBSのみを同様に添加した標準血漿をコントロールとして測定したところ、コントロールが44秒、203A205Gトロンピンでは48秒であった。

【0068】

(5) PRP (多血小板血漿: platelet rich plasma) を用いた203A205Gトロンピンの抗血

小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2500rpmで10分遠心分離することによりPPP（乏血小板血漿：platelet poor plasma）を得た。100 μ l添加した場合に203A205Gトロンビンの終濃度が80 μ g/mlとなるように濃度が調整された、203A205Gトロンビンの5mM リン酸緩衝液 0.15M

NaCl（pH7.4）溶液100 μ lをPRP130 μ lに添加し、血小板凝集惹起物質として5mg/mlリストセチン5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl（pH7.4）溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率（波長700nm）の測定はEASY TRACER ET-800（東京光電株式会社）を用いて行った。結果を図11に示す。なお、縦軸の透過率は血小板凝集能と正の相関を示す値である。

評価2：血小板凝集惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン（ヒト野生型）5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl（pH7.4）溶液を用いた以外は、評価（1）の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl（pH7.4）100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800（東京光電株式会社）を用いて行った。結果を図12に示す。

図11、12より、80 μ g/mlの濃度の203A205Gトロンビンを添加しても血小板凝集の有意な抑制効果は得られない結果が得られた。

【0069】

（6）203A205Gトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

203A205Gトロンビン誘導体またはアンヒドロトロンビンの約0.1mg/mlの10mM リン酸緩衝液（pH7.4）溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット（日製産業社）に添加し、10分間、25℃で攪拌することにより、被験サンプル（トロンビン誘導体）をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、203A205Gトロンビンまたはアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。（各キュベットに203A205Gトロンビンは4100arc、アンヒドロトロンビンは2400arcそれぞれ結合した。）引き続き1M エタノールアミン（pH8）を0.2ml加えブロッッキング処理を行った。

203A205Gキュベットまたはアンヒドロトロンビンキュベットにそれぞれ100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図13と図14に示す。

図14よりアンヒドロトロンビンキュベットにはフィブリノゲンとFVIIIがほぼ同程度結合しているのに対し、図13より203A205GキュベットにはFVIIIの方がフィブリノゲンより少ない結合が確認された。構造変化を最小にするため単純に活性中心セリンをデヒドロアラニンに変換する事で得られたアンヒドロトロンビンに比較し、203A205Gトロンビンは低いFVIII特異性を有している事が分かった。

又、アンヒドロトロンビンに対し203A205Gトロンビンは固相化量との比で換算にFVIII結合が約11%に低下していた。

そのため203A205GトロンビンはAPTT延長効果が低いものと考えられた。

【0070】

（7）カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）及びプロトロンビン時間（PT）の測定

1mg/5mlの203A205Gトロンビン／50mMリン酸緩衝液 0.5M NaCl（pH6.5）を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl（pH6.5）に4℃で3時間透析した後、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide（和光純薬）を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、203A205Gトロンビンのカルボキシル基を修飾した。残存カルボジイミドは終濃度0.5Mになるようにグリシンを添加し反応を終了させた。

質量分析の結果分子量約1400増加しており約15個のカルボキシル基が修飾されていた。

【0071】

評価1：APTT測定1

修飾された203A205Gトロンビン500 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1 mlに溶解したもの50 μ lを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：10の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) を、標準血漿（国際試薬社）に1：10（容量比）となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは38秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205GトロンビンのAPTTは65秒であった。

評価2：APTT測定2

修飾された203A205Gトロンビン50 μ gを、1 mlのPBSに溶解したもの100 μ lを、標準血漿（国際試薬社）100 μ lに添加し、APTTを測定した。PBSを標準血漿（国際試薬社）に同様に添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは44秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205GトロンビンのAPTTは85秒であった。

【0072】

評価3：PTの測定

修飾された203A205Gトロンビン500 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1 mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：10の割合となるように添加し、PTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) を、標準血漿（国際試薬社）に1：10（容量比）となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対しカルボキシル基修飾203A205GトロンビンのPTは21秒であった。

【0073】

（8）PRP（多血小板血漿：platelet rich plasma）を用いたカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPP（乏血小板血漿：platelet poor plasma）を得た。100 μ l添加した場合にカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの終濃度が37 μ g/mlとなるように濃度が調整された、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液100 μ lをPRP130 μ lに添加し、血小板凝集惹起物質として5mg/mlリストセチン5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率（波長700nm）の測定はEASY TRACER ET-800（東京光電株式会社）を用いて行った。結果を図1に示す。なお、縦軸の透過率は血小板凝集能と正の相関を示す値である。

評価2：血小板凝集惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン（ヒト野生型）5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800（東京光電株式会社）を用いて行った。結果を図2に示す。

図1、図2より、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを用いることによって血小板凝集が低下したことから、該トロンビン誘導体はリストセチン惹起血小板凝集及び修飾トロンビン惹起血小板凝集において抗血小板効果を示すことがわかった。

【0074】

以上の結果から、203A205Gトロンビンは、活性が検出限界以下に低下しているが、基質への結合能は保持していることがわかった。また、APTTの結果および血小板凝集抑制実験の結果から、203A205Gトロンビンは80 μ g/mlにおいては抗血栓効果、抗血小板効果を有

していなかったが、約15個のカルボキシル基が修飾を受けたカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンは低濃度においても十分な抗血栓効果、抗血小板効果を有していることがわかった。

また、IAsysを用いた基質特異性実験より203A205GトロンビンはFVIII特異性が低く、また結合力もアンヒドロトロンビンに比較し固定化蛋白対比では11%程に低下しているため高いAPTT延長効果が無いことが推測される。化学修飾を行った203A205Gトロンビンは後の実験で示す205A43Aトロンビン同等のAPTT延長効果であったが、血小板凝集抑制効果においては205A43Aトロンビンに比較し非常に強い効果を示した。化学修飾を行った205A43Aトロンビンと比較した場合、化学修飾を行った203A205GトロンビンはAPTT延長効果は弱いものも血小板凝集抑制効果は同等に強い性質を示した。

【0075】

(9) 203A205Gトロンビンのカルボキシル基修飾個数と抗血栓性の関係の評価

(9) - 1. 修飾個数1から10個のカルボキシル基修飾203A205G誘導体の作製

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬) を終濃度2mg~20mgになるように加え25℃にて60分~120分インキュベーションを行い、203A205Gトロンビンの2個~28個のカルボキシル基を修飾した修飾誘導体1~5を得た。

【0076】

(9) - 2. PBSに透析した修飾誘導体1~5のAPTT延長効果

修飾された203A205Gトロンビン50μgを、1mlのPBSに溶解したもの100μlを、標準血漿(国際試薬社) 100μlに添加し、APTTを測定した。PBSを標準血漿(国際試薬社)に同様に添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。

結果を以下に示す。

203A205Gトロンビン	約0個修飾	APTT	47秒
203A205Gトロンビン修飾誘導体1	約1個修飾	APTT	48秒
203A205Gトロンビン修飾誘導体2	約3個修飾	APTT	56秒
203A205Gトロンビン修飾誘導体3	約5個修飾	APTT	61秒
203A205Gトロンビン修飾誘導体4	約10個修飾	APTT	77秒
203A205Gトロンビン修飾誘導体5	約26個修飾	APTT	60秒

以上よりEDCを用いた203A205Gトロンビンにおいて3個以上のカルボキシル基修飾によって顕著なAPTT延長効果が確認された。修飾体1~4における修飾前後における回収率は75%以上であった。26個修飾された誘導体においてはAPTT延長効果は見られるものの、凝集がおき、回収率が40%と低く過度な修飾による回収率の低下が起こることが分かった。

【0077】

[実験例3]

(1) B鎖205セリンをアラニンに置換したトロンビン(以下205Aトロンビン)の発現

205AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号9に示す。

205Aトロンビンを実験例1の(1)の方法に準じて発現させた。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上 ほぼ純化された205Aトロンビンが約6mg得られた。

【0078】

(2) 205Aトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を前述の方法Bに従って測定した結果、活性化されたFXIIIのA鎖は確認されなかった。

【0079】

(3) 205Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

205Aトロンビン $500\mu\text{g}$ を、PBS 1ml に溶解した溶液 $100\mu\text{l}$ を、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、205AトロンビンのAPTTは95秒であった。

205Aトロンビン $50\mu\text{g}$ を、PBS 1ml に溶解した溶液 $100\mu\text{l}$ を、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは41秒であったのに対し、205AトロンビンのAPTTは62秒であった。

【0080】

さらに、 $1\text{mg}/5\text{ml}$ の205Aトロンビン／ 50mM リン酸緩衝液 0.5M NaCl ($\text{pH}6.5$) を 0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl ($\text{pH}6.5$) に 4°C で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬) を、その濃度が $20\text{mg}/\text{ml}$ になるように添加し、 25°C にて1時間インキュベーションし、205Aトロンビンのカルボキシル基を修飾した。約80%の修飾誘導体が可溶化状態で得られた。

カルボキシル基修飾205Aトロンビン $50\mu\text{g}$ を、PBS 1ml に溶解した溶液 $100\mu\text{l}$ を、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、カルボキシル基修飾205AトロンビンのAPTTは79秒であった。

【0081】

(4) プロトロンビン時間 (PT) の測定

205Aトロンビン及びカルボキシル基修飾205Aトロンビン $50\mu\text{g}$ を、PBS 1ml に溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）にそれぞれ容量比で1：1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1（容量比）となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは21秒であったのに対し205Aトロンビンは21秒、カルボキシル基修飾205AトロンビンのPTは20秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

【0082】

(5) PRP（多血小板血漿：platelet rich plasma）を用いた205Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血 10ml を、 800rpm で15分遠心し、上澄みよりPRP 2ml を得た。さらに 2800rpm で10分遠心分離することによりPPP（乏血小板血漿：platelet poor plasma）を得た。 $100\mu\text{l}$ 添加した場合に205Aトロンビンの終濃度が $70\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように濃度が調整された、205Aトロンビンの 5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl ($\text{pH}7.4$) 溶液 $100\mu\text{l}$ をPRP $130\mu\text{l}$ に添加し、血小板凝集惹起物質として $5\text{mg}/\text{ml}$ リストセチン 5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl ($\text{pH}7.4$) 溶液 $35\mu\text{l}$ を添加した。コントロールとして、PRP $130\mu\text{l}$ に、 5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl 、 $\text{pH}7.4$ $100\mu\text{l}$ を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率（波長 700nm ）の測定はEASY TRACER ET-800（東京光電株式会社）を用いて行った。しかしながら本実験で $70\mu\text{g}/\text{ml}$ において血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

評価2：血小板凝集惹起物質として $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビン（ヒト野生型） 5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl ($\text{pH}7.4$) 溶液を用いた以外は、評価（1）の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP $130\mu\text{l}$ に、 5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl ($\text{pH}7.4$) $100\mu\text{l}$ を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800（東京光電株式会社）を用いて行った。しかしながら本実験で $70\mu\text{g}/\text{ml}$ においては血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

以上より、205Aトロンピンは弱いAPTT延長効果が確認された。しかしながら抗血小板効果は確認されなかった。

【0083】

(6) PRPを用いた修飾205Aトロンピンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100 μ l添加した場合に修飾205Aトロンピンの終濃度が、100 μ g/mlになるように濃度が調製された、修飾205AトロンピンのPBS溶液を、100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として(i)1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンピンPBS溶液、(ii)5mg/mlリストセチン PBS溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し血小板凝集抑制実験を行った。(i)(ii)の結果を図21、22に示す。

【0084】

(7) 205Aトロンピンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

205Aトロンピン約0.1mg/mlの濃度の10mM リン酸緩衝液(pH7.7)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25℃で攪拌することにより、被験サンプル(トロンピン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、205Aトロンピン固定化キュベットを得た。(約600arc固相化)引き続き1M エタノールアミン(pH8)を0.2ml加えブロッッキング処理を行った。

205Aトロンピンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図23に示す。図23より205AトロンピンはFVIII特異性が増していたがFVIII結合シグナルそのものが相対的にアンヒドロトロンピン(図14)に比較し40%程度にまで低下した。この為、195Aトロンピンはそれほど強い抗血栓能を示さなかったと考えられる。また、195Aトロンピンは修飾することでAPTT延長効果を増し、且つ修飾トロンピン惹起血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集両方に対し抑制効果を示した。

【0085】

[実験例4]

(1) B鎖205セリンをスレオニンに置換したトロンピン(以下205Tトロンピン)の発現

205TトロンピンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Tトロンピンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号11に示す。

205Tトロンピンを実験例1の(1)の方法で発現させた。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンピン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上 ほぼ純化された205Tトロンピンが約5mg得られた。

【0086】

(2) 205Tトロンピンの基質分解活性測定

(1)で得られた205Tトロンピンのトロンピン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、205Tトロンピンの基質分解活性は、ヒト野生型トロンピンに比較し約2.5 $\times 10^{-4}$ の活性であった。

さらにトロンピンのトロンピン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、ほぼ全てのFXIIIのA鎖は野生型トロンピン同様の活性化を受け、分解された活性化血液凝固XIII因子のバンドが確認された。以上より、205Tトロンピンは活性が残存していることがわかった。

【0087】

[実験例5]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンピン(203A205A99Nトロンピン)の発現

203A205A99NトロンピンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成

した。203A205A99Nトロンビン塩基配列を配列番号13に示す。

203A205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された203A205A99Nトロンビンが約5mg得られた。

【0088】

(2) 203A205A99Nトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた203A205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

【0089】

(3) 203A205A99Nトロンビン添加血液のAPTTの測定

203A205A99Nトロンビン100 μ gを5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4)を、標準血漿(国際試薬社)に容量比1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、203A205A99NトロンビンのAPTTは60秒であった。以上より、203A205A99Nトロンビンはヒルジンゲルへの結合能を有し且つ、活性が十分に低下しているものも十分な抗血栓効果を有していないことがわかった。

【0090】

[実験例6]

(1) B鎖205セリンをバリンに置換したトロンビン(以下205Vトロンビン)の発現

205VトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Vトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号15に示す。

205Vトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Vトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

【0091】

[実験例7]

(1) B鎖205セリンをアスパラギン酸に置換したトロンビン(以下205Dトロンビン)の発現

205DトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Dトロンビン塩基配列を配列番号17に示す。

205Dトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Dトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

【0092】

[実験例8]

(1) B鎖205セリンをアスパラギンに置換したトロンビン(以下205Nトロンビン)の発現

205NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Nトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号19に示す。

205Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Nトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

【0093】

[実験例9]

アンヒドロトロンビンのトロンビンレセプター結合能の測定を、方法Dにより測定したところ、該アンヒドロトロンビンとトロンビンレセプターの解離定数は $1.2\mu\text{M}$ であった。

【0094】

[実験例10]

(1) B鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン(205A99Nトロンビン)の発現

205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。

205A99Nトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号21に示す。

205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205A99Nトロンビンが約5.5mg得られた。

【0095】

(2) 205A99Nトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

【0096】

(3) 205A99Nトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定 205A99Nトロンビン $50\mu\text{g}$ を、PBS 1mlに溶解し、その $100\mu\text{l}$ を、標準血漿(国際試薬社)に $100\mu\text{l}$ と混和し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、205A99NトロンビンのAPTTは58秒であった。

【0097】

[実験例11]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンに置換したトロンビン(203A205Aトロンビン)の発現

203A205AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203A205Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号23に示す。

203A205Aトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された203A205Aトロンビンが約4mg得られた。

【0098】

(2) 203A205Aトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた203A205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。203A205AトロンビンはヒルジンC末端ペプチド結合性を有し且つ十分に活性を失っていることが分かった。203A205Aトロンビン $100\mu\text{g}$ を、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4)を、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合とな

るように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、203A205AトロンビンのAPTTは59秒であった。

【0099】

(3) カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、1mg/5mlの203A205Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4℃で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬) を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、203A205Aトロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約80%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾203A205Aトロンビン50μgを、PBS 1mlに溶解した溶液100μlを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205Aトロンビンはそれぞれ46秒であった。

【0100】

(4) プロトロンビン時間 (PT) の測定

203A205Aトロンビン及びカルボキシル基修飾203A205Aトロンビン50μgを、PBS1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）にそれぞれ容量比で1：1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1（容量比）となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対し203A205Aトロンビンは21秒、カルボキシル基修飾203A205AトロンビンのPTは20秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

【0101】

(5) PRPを用いた203A205Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100μl添加した場合に203A205Aトロンビンの終濃度が、100μg/mlになるように濃度が調製された、203A205AトロンビンのPBS溶液を、100μlずつPRP130μlに添加し、惹起物質として(i) 1μg/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液、(ii) 5mg/mlリストセチン PBS溶液35μlを添加した。コントロールとして、PRP130μlに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100μlを添加し血小板凝集抑制実験を行ったが(i) (ii)いずれの惹起物質に対してもコントロールと203A205Aトロンビンに違いは無かった。

【0102】

(6) 203A205Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

203A205Aトロンビン約0.1mg/mlの濃度の10mM リン酸緩衝液 (pH7.7) 溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット（日製産業社）に添加し、10分間、25℃で攪拌することにより、被験サンプル（トロンビン誘導体）をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、203A205Aトロンビン固定化キュベットを得た。（約600arc固相化）引き続き1M エタノールアミン (pH8) を0.2ml加えブロッキング処理を行った。203A205Aトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図24に示す。図24より203A205AトロンビンはFVIII及びフィブリノゲン両方にアンヒドロトロンビンと比較すると固定化蛋白量との対比による値で約5%のシグナルしか示さなかった。本配列の誘導体の基質結合能そのものが低下しそれによって抗凝固能を有さなかった推測される。

【0103】

[実験例12]

(1) B鎖205セリンをアラニンに、B鎖43ヒスチジンをアラニンに置換したトロン

ピン（205A43Aトロンビン）の発現

205A43AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A43Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号25に示す。

205A43Aトロンビンを実験例1の（1）の方法で発現した。実験例1の（2）の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の（3）の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205A43Aトロンビンが約3mg得られた。

【0104】

（2）205A43Aトロンビンの基質分解活性測定

（1）で得られた205A43Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

205A43Aトロンビン50 μ gを、PBS1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは46秒であったのに対し、205A43AトロンビンのAPTTは78秒であった。

【0105】

（3）PTの測定：205A43Aトロンビン50 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、PTを測定した。またPBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1の割合となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは24秒であったのに対し、205A43AトロンビンのPTは25秒であった。

【0106】

（4）カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の測定

1mg/5mlの205A43Aトロンビン／50mMリン酸緩衝液／0.5M NaCl（pH6.5）を0.25M グリシンエチルエステル／0.5M NaCl（pH6.5）に4℃で3時間透析した後、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide（和光純薬）を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、205A43Aトロンビンのカルボキシル基を修飾した。修飾体の質量分析の結果、約16個のカルボキシル基が修飾された。

【0107】

修飾された205A43Aトロンビン50 μ gをPBS 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは46秒であったのに対し、修飾205A43AトロンビンのAPTTは190秒であった。

【0108】

（5）プロトロンビン時間（PT）の測定

カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン50 μ gを、PBS1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1（容量比）となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは22秒であったのに対しカルボキシル基修飾205A43AトロンビンのPTは23秒であり修飾体においても205A43AトロンビンはPTの延長効果は示さなかった。

【0109】

（6）PRPを用いた205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを

得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100 μ l添加した場合に205A43Aトロンビンの終濃度が、30 μ g/mlになるように濃度が調製された、205A43AトロンビンのPBS溶液を、100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として5mg/ml リストセチン PBS溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。

結果を図3に示す。

評価2：惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用いた以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ lに、PBS 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図4に示す。

評価3：惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用い100 μ l添加した場合に205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ120 μ g/ml、30 μ g/mlになるように濃度が調製された、205A43AトロンビンのPBS溶液を加え、評価1の方法に準じて実験を行った。結果を図15に示す。

評価4：205A43Aトロンビンの終濃度が、150 μ g/mlになるように濃度が調製された、205A43AトロンビンのPBS溶液を、100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として5mg/ml リストセチン PBS 溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、PBS 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。205A43Aトロンビンは高濃度においてもリストセチン惹起血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

【0110】

(7) PRPを用いたカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2500rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100 μ l添加した場合、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ30 μ g/ml、15 μ g/ml、7.5 μ g/mlになるように濃度が調整された、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液3種類を、それぞれ100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として5mg/ml リストセチン5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図5～7に示す。

評価2：惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価(1)の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図8～10に示す。

【0111】

(8) 205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

205A43Aトロンビン誘導体及びアンヒドロトロンビンの約0.1mg/mlの濃度の10mM リン酸緩衝液 (pH7.7) 溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット (日製産業社)に添加し、10分間、25℃で攪拌することにより、被験サンプル (トロンビン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。1307arcの205A43Aトロンビンがキュベットに固定化された。引き続き1M エタノールアミン (pH8)を0.2ml加えブロッキング処理を行った。205A43Aキュベット及びアンヒドロトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図16および図14に示す。図14よりアンヒドロトロンビンキュベットにはフィブリノゲンとFVIIIがほぼ同程度結合しているのに対し、図16から205A43AキュベットにはFVIIIの方がフィブリノゲンより多い結合が確認された。また、アンヒドロトロンビンに対し固定化蛋白との対比で同等のFVIII親和性を有していると考えられた。

【0112】

(9) 205A43Aトロンビンの修飾個数とAPTT延長効果の実験

1mg/5mlの205A43Aトロンビン／50mMリン酸緩衝液 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4℃で3時間透析した後、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬) を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて10分、60分、120分反応させカルボキシル基を修飾した。各反応時間に残存カルボジイミドを終濃度0.5Mになるようにグリシンを添加し反応を終了させた。

未反応205A43Aトロンビンに比較し10分反応サンプルは約480Da増加(5.6個修飾に相当) 60分後 1240Da増加(14.6個修飾に相当)、120分後 1900(22.4個修飾に相当)するカルボキシル基修飾反応が確認された。

【0113】

各修飾体のAPTT延長効果

各修飾体をそれぞれ50、25、12.5μg/mlに調整しPBSに透析した。各サンプルと標準血漿を1:1に混合しAPTTを測定した。

測定結果を下記に示す。

【0114】

【表1】

表1

	APTT		平均(秒)	比
透析外液コントロール	42	42	42	1
0分 サンプル濃度 12.5μg/ml	61	62	61.5	1.46
0分 サンプル濃度 25μg/ml	70	71	70.5	1.68
0分 サンプル濃度 50μg/ml	83	80	81.5	1.94
10分 サンプル濃度 12.5μg/ml	87	89	88	2.1
10分 サンプル濃度 25μg/ml	100	103	101.5	2.42
10分 サンプル濃度 50μg/ml	118	114	116	2.76
60分 サンプル濃度 12.5μg/ml	88	90	89	2.12
60分 サンプル濃度 25μg/ml	110	112	111	2.64
60分 サンプル濃度 50μg/ml	140	143	141.5	3.37
120分 サンプル濃度 12.5μg/ml	88	90	89	2.12
120分 サンプル濃度 25μg/ml	137	125	131	3.12
120分 サンプル濃度 50μg/ml	240	250	245	5.83

【0115】

以上の結果より 205A43Aトロンビンにおいては5.6個の修飾においても未修飾よりもAPTTの延長効果の増強が確認された。14.6、22.4個と修飾数が増えるにつれAPTT延長効果は増加したが 22.4個修飾においては回収率は約50%にまで低下した。回収率とAPTT延長効果の観点から5個以上の修飾が修飾によるAPTT延長効果には効率的であるが22個以上の修飾は回収率の低下があることが確認された。

構造変化を最小にするため単純に活性中心セリンをデヒドロアラニンに変換する事で得られたアンヒドロトロンビンに比較し、205A43Aトロンビンは高いFVIII特異性を有している事が分かった。

【0116】

以上の結果から、205A43Aトロンビン誘導体は化学修飾の有無に関わらず強いAPTT延長効果を有した。また化学修飾によってさらにAPTT延長効果は増加した。M-トロンビン惹起血小板凝集抑制(PAR1活性化阻害)に依存した血小板凝集抑制効果は化学修飾の有無にかかわらず有したが、化学修飾後の方が非常に強いものであった。したがって、205A43Aトロンビン誘導体はAPTTを中心とした血液凝固に主に強く作用し且つおだやかな血小板凝集

抑制効果を有するのに対し、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン誘導体はAPTTと共に強い抗血小板能を有する事が分かった。修飾された205A43AトロンビンはM-トロンビン惹起血小板凝集抑制（PAR1活性化阻害）に加えリストセチン惹起血小板凝集抑制効果も有していたが、修飾をしていない205A43Aトロンビンは高濃度においてもリストセチン惹起血小板凝集を有してはいなかった。よって下記に示される特徴を有した抗血栓トロンビンが得られた。

修飾205A43Aトロンビン

APTT延長効果（大）、PAR1阻害（大）、リストセチン惹起血小板凝集（大）

205A43Aトロンビン

APTT延長効果（大）、PAR1阻害（小）、リストセチン惹起血小板凝集（無し）

また、IAsysを用いた基質特異性確認実験において205A43Aトロンビンが非常に高いAPTT延長効果を有していた理由として、活性中心セリン及びヒスチジンを同時に変異させた本誘導体はその変異によって、完全に基質分解活性を失うとともに、アンヒドロトロンビンに比較し高いFVIII特異性（フィブリノゲンに対し特異性が低下）を有していたためと推測された。

後述の実験例16および17記載のように他のアミノ酸の置換の組み合わせにおいても活性中心Ser、His を同時に変異させた誘導体はAPTT延長を主効果とした高い抗血栓能を有する事がわかった。

【0117】

[実験例13]

（1）B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをグリシンにB鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン（77E203A205Gトロンビン）の発現

77E203A205GトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E203A205Gトロンビン塩基配列を配列番号27に示す。

77E203A205Gトロンビンを実験例1の（1）の方法で発現した。実験例1の（2）の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の（3）の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E203A205Gトロンビンが約3mg得られた。

【0118】

（2）77E203A205Gトロンビン添加血液のAPTTの測定

77E203A205Gトロンビン50μgをPBSに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。同様にPBSを、標準血漿（国際試薬社）に容量比1：1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは44秒であったのに対し、77E203A205GトロンビンのAPTTは74秒であった。

【0119】

（3）PRPを用いた77E203A205Gトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100μl添加した場合に77E203A205Gトロンビンの終濃度が、70μg/mlになるように濃度が調製された、77E203A205GトロンビンのPBS溶液を、100μlずつPRP130μlに添加し、惹起物質として5mg/mlリストセチンPBS溶液35μlを添加した。コントロールとして、PRP130μlに、5mMリン酸緩衝液0.15M NaCl、pH7.4 100μlを添加し透過率の経時変化を記録したがリストセチン惹起血小板凝集抑制作用は確認されなかった。

評価2：惹起物質として1μg/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用いた以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130μlに、PBS 100μlを添加し透過率の経時変化を記録したが、カルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制作用を示さなかった。

以上より、203A205Gトロンビンは十分な抗血栓能を有していなかったが77E203A205Gト

ロンピンは77リシンの置換によりフィブリノゲン親和性を低下させることにより大幅なAPTT延長効果の増加が起こった。また、77E203A205G トロンピンは修飾トロンピン及びリストセチン惹起抗血小板凝集に対し抑制効果を示さなかった。

【0120】

(4) カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、1mg/5mlの77E203A205Gトロンピン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4℃で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬) を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、77E203A205Gトロンピンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約35%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾77E203A205G トロンピン50 μ gを、PBS 1mlに溶解した溶液100 μ lを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、カルボキシル基修飾77E203A205GトロンピンのAPTTはそれぞれ77.5秒であった。

【0121】

(5) プロトロンビン時間 (PT) の測定

77E203A205Gトロンピン及びカルボキシル基修飾77E203A205Gトロンピン50 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）にそれぞれ容量比で1：1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1（容量比）となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対し77E203A205Gトロンピンは22秒、カルボキシル基修飾77E203A205GトロンピンのPTは23秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

【0122】

(6) PRPを用いたカルボキシル基修飾77E203A205G トロンピンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100 μ l添加した場合に修飾77E203A205G トロンピンの終濃度が、50 μ g/mlになるように濃度が調製された、修飾77E203A205GトロンピンのPBS溶液を、100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として5mg/mlリストセチン PBS溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図25に示す。

【0123】

評価2：惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンピンPBS溶液を用いた以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ lに、PBS 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図26に示す。

以上の結果より修飾77E203A205Gトロンピンは化学修飾前に比較しAPTT延長効果の増強は確認されなかったが、修飾トロンピン惹起血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果を示した。また、77のグルタミン酸への置換により置換前に比較し回収率の顕著な低下が確認された。

【0124】

(7) 203A205G77Eトロンピンのフィブリノゲン及びトロンボモジュリンへの結合特異性の確認

203A205Gトロンピン誘導体の0.1mg/ml 10mM リン酸バッファー (pH7.7) 溶液、および203A205G77Eトロンピン誘導体の0.1mg/ml 10mM リン酸バッファー (pH7.7) 溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキューベット（日製産業社）に添加し、10分間、25℃で攪拌することにより、被験サンプル（トロンピン誘導体）をNHS活性化CMデキストランキューベットに固定し、203A205Gトロンピン固定化キューベットおよび203A205G77Eトロンピン固

定化キュベットを得た。203A205Gキュベットには約4100arcの蛋白質が203A205G77Eキュベットには約2000arcの蛋白質が固相化された。引き続き1M エタノールアミン (pH8) を0.2ml加えブロッッキング処理を行った。

さらに両キュベットを50mM リン酸緩衝液、2M NaCl、30mM ベンズアミジン (pH7.4) で洗浄、再生後、両キュベットに500nMのフィブリノゲン溶液 (50mM リン酸緩衝液、0.15M NaCl (pH7.4) に溶解) を100 μ l加えたところ、3分後203A205Gトロンビン固相化キュベットには約300arc secのフィブリノゲンが吸着され、203A205G77Eトロンビン固相化キュベットには約80arc secのフィブリノゲンが吸着された。

さらに両キュベットを同様に洗浄、再生後、両キュベットに500nMの血液凝固第8因子溶液 (50mM Tris塩酸 0.15M NaCl 10mM CaCl₂ (pH7.4) に溶解) を100 μ l加えたところ3分後203A205Gトロンビン固相化キュベットには約300arc secの血液凝固第8因子が吸着され、203A205G77Eトロンビン固相化キュベットには約300arc secの血液凝固第8因子が吸着された。

さらに両キュベットを50mM リン酸緩衝液、2M NaCl、30mM ベンズアミジン (pH7.4) で洗浄、再生後、203A205Gトロンビン固定化キュベットおよび203A205G77Eトロンビン固定化キュベットそれぞれに、50nMの可溶性トロンボモジュリン溶液 (コスモバイオ) (50mM リン酸緩衝液、0.15M NaCl (pH7.4) に溶解) を100 μ l加えたところ、3分後 203A205Gトロンビン固相化キュベットには約100arc secのトロンボモジュリンが吸着され、203A205G77Eトロンビン固相化キュベットには約20arc secのトロンボモジュリンが吸着された。

以上の結果より203A205Gトロンビン誘導体に新たにB鎖77リシンのグルタミン酸への置換を加えることでキュベット上で血液凝固第8因子吸着に対してフィブリノゲン吸着量は約3分の1に トロンボモジュリン吸着は約2分の1に低下している事がわかった。

またIAsys FAST FIT PROGRAM (日製産業) による解析の結果203A205G に対するフィブリノゲン結合定数は10.8nM、血液凝固第8因子親和性は5.07nM、203A205G77Eに対するフィブリノゲン親和性は190nM、血液凝固第8因子親和性は22.5nMであった。

このB鎖77リシンの置換によりフィブリノゲンに対するFVIII特異性の向上に起因し実験例13に記載の77E203A205Gトロンビン誘導体は203A205Gトロンビン誘導体に比較し高いAPTT延長能を有している事が予測された。

【0125】

【実験例14】

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンにB鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン (77E203A205A99Nトロンビン) の発現

77E203A205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E203A205A99Nトロンビン塩基配列を配列番号29に示す。

77E203A205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E203A205A99Nトロンビンが約3mg得られた。

【0126】

(2) 77E203A205A99Nトロンビン添加血液のAPTTの測定77E203A205A99Nトロンビン50 μ gをPBSに溶解したものを、標準血漿 (国際試薬社) に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。同様にPBSを、標準血漿 (国際試薬社) に容量比1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは41秒であったのに対し、77E203A205A99NトロンビンのAPTTは39秒であった。以上より、77E203A205A99Nトロンビ

ンはヒルジンゲルへの結合能を有し且つ、活性が十分に低下し且つフィブリノゲン親和性を低下させる変異を加えてはているものも十分な抗APTT効果を有していないことがわかった。

【0127】

実験例15

B鎖203グリシンをアラニンに置換したトロンビン（203Aトロンビン）の発現

203AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203Aトロンビン塩基配列を配列番号31に示す。

203Aトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された203Aトロンビンが約2mg得られた。

203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した。結果を図20に示す。FXIIIのA鎖は30分後においてすでに分解物が確認され3時間後には半量以上が分解を受けた。

さらに、203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Cに従って測定した結果、3時間後クロットが形成された。

以上の結果より 203Aトロンビンは 非特許文献5において完全に活性を失った誘導体と報告されているものも、本発明における蛋白基質を用いた活性測定法においては、抗血栓剤として使用する目的においては明らかな蛋白基質分解活性が確認され抗血栓剤として使用することが困難であることが分かった。

【0128】

実験例16

(1) 205セリンをグリシンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン（205G43Aトロンビン）の発現

205G43AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205G43Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号33に示す。

205G43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205G43A トロンビンが約0.5mg得られた。

【0129】

(2) 205G43A トロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205G43A トロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、205G43A トロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。205G43A トロンビンはヒルジンC末端ペプチド結合性を有し且つ十分に活性を失っていることが分かった。205G43A トロンビン24 μ g及び12 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは43秒であったのに対し、205G43AトロンビンのAPTTはそれぞれ62秒、55秒であった。

以上の結果より、活性中心のセリン、ヒスチジンを同時に置換した205G43A トロンビンは低濃度においても化学修飾を行わずに高いAPTT延長効果を示すことがわかった。

【0130】

実験例17

(1) 205セリンをアラニンに43ヒスチジンをセリンに置換したトロンビン（205A43Sトロ

ンビン)の発現

205A43SトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A43Sトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号35に示す。

205A43S トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205A43S トロンビンが約3mg得られた。

【0131】

(2) 205A43S トロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205A43S トロンビンの基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。205A43S トロンビンはヒルジンC末端ペプチド結合性を有し且つ十分に活性を失っていることが分かった。次に205A43S トロンビン40 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、203A205SトロンビンのAPTTは72秒であった。

以上の結果より、活性中心のセリン、ヒスチジンを同時に置換した205A43S トロンビンは化学修飾を行わずに高いAPTT延長効果を示すことがわかった。

【0132】

(3) 205A43Sトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

205A43Sトロンビン誘導体またはアンヒドロトロンビンの 約0.1mg/mlの10mM リン酸緩衝液(pH7.4)溶液を、NHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25℃で攪拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、205A43Sトロンビンまたはアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。約1200arcの205A43Sトロンビンがキュベットに固定化された。引き続き1M エタノールアミン(pH8)を0.2ml加えブロッキング処理を行った。205A43Sキュベットまたはアンヒドロトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲンまたはFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図17に示す。図14よりアンヒドロトロンビンキュベットにはフィブリノゲンとFVIIIがほぼ同程度結合しているのに対し、図17より205A43SトロンビンキュベットにはFVIIIの方がフィブリノゲンより多い結合が確認された。また固定化蛋白との対比を考えると少なくとも205A43Sトロンビンはアンヒドロトロンビン同等のFVIII親和性を有することが示された。構造変化を最小にするため単純に活性中心セリンをデヒドロアラニンに変換する事で得られたアンヒドロトロンビンに比較し、205A43Sトロンビンは高いFVIII特異性を有している事が分かった。

【0133】

実験例18

(1) B鎖77リシンをグルタミン酸に205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(77E205A43Aトロンビン)の発現

77E205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号37に示す。

77E205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E205A43A トロンビンが約3mg得られた。

【0134】

(2) 77E205A43A トロンビン50 μ g及び25 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、

標準血漿（国際試薬社）に1：1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、77E205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ92秒、85秒であった。

【0135】

（3）PRPを用いた77E205A43A トロンビンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100 μ l添加した場合に77E205A43A トロンビンの終濃度が、100 μ g/mlになるように濃度が調製された、77E205A43AトロンビンのPBS溶液を、100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として5mg/mlリストセチン PBS溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録したが、コントロールと同様の活性化曲線を示し、抑制作用は示さなかった。

【0136】

評価2：惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用いた以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ lに、PBS 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図27に示す。

以上の結果より77E205A43A トロンビンは77リシンをグルタミン酸に変化させることでフィブリノゲン親和性を特異的に低下され、もともと活性中心のセリン及びヒスチジンの同時変異によりFVIII特異性が高まり強いAPTT抑制効果を持っていた205A43Aよりも、さらに強いAPTT抑制効果を示すことがわかった。また、77E205A43A トロンビンはリストセチン惹起血小板凝集抑制能は示さなかったが、修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制効果は示した。

【0137】

（4）カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、1mg/5mlの77E205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4℃で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて0.5時間インキュベーションし、77E205A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約40%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾77E205A43A トロンビン50 μ g及び25 μ gを、PBS 1mlに溶解した溶液100 μ lを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1：1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿（国際試薬社）に1：1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、カルボキシル基修飾77E205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ119、89秒であった。

【0138】

（5）PRPを用いたカルボキシル基修飾77E205A43A トロンビンの抗血小板機能の評価

評価1：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100 μ l添加した場合に修飾77E205A43A トロンビンの終濃度が、30 μ g/mlになるように濃度が調製された、修飾77E205A43AトロンビンのPBS溶液を、100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として5mg/mlリストセチン PBS溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図28に示す。

【0139】

評価2：惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用いた以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ lに、PBS 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。修飾77E205A43Aトロンビンは結果を終濃度30 μ g/mlにてカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集を完全に抑制した。

以上の結果より77E205A43Aトロンピンは修飾によりAPTT延長能が増加した。又、修飾トロンピン惹起血小板凝集及びリストセチン惹起血小板凝集抑制効果も示した。しかしながら77E203A205Gトロンピンのカルボキシル基修飾体同様に77E205A43Aトロンピンは修飾語の回収率はB鎖77のグルタミン酸への置換によって205A43Aトロンピンの修飾体に比較し大きく低下した。

【0140】

実験例19

(1) B鎖24グルタミンをグルタミン酸に205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンピン(24E205A43Aトロンピン)の発現

24E205A43A トロンピンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。24E205A43A トロンピンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号39に示す。

24E205A43A トロンピンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画に若干のバンドが確認された。また、溶出ピークに大部分のトロンピンのバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った後、組み換えトロンピンを含有した溶出溶液を50mM NaHCO₃ pH8に対して透析し、50mM NaHCO₃ pH8 で平衡化したHI TRAP ベンズアミジンカラム5ml(ファルマシア社) にアプライした。50mM NaHCO₃ 0.3M NaCl pH8にて充分洗浄した後 50mM NaHCO₃ 0.3M NaCl 0.1M ベンズアミジン pH8にて溶出した。SDS-PAGE上ほぼ純化された24E205A43A トロンピンが約1mg得られた。

24E205A43A トロンピン50μgを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、24E205A43AトロンピンのAPTTは62秒であった。

【0141】

(2) 24E205A43Aトロンピン及びアンヒドロトロンピンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

24E205A43Aトロンピン誘導体又はアンヒドロトロンピンを約0.1mg/ml含む 10mM リン酸緩衝液(pH7.4)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25℃で攪拌することにより、被験サンプル(トロンピン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、24E205A43Aトロンピン及びアンヒドロトロンピン固定化キュベットを得た。(それぞれ1380arc, 2400arc固相化)引き続き1M エタノールアミン(pH8)を0.2ml加えブロッキング処理を行った。

24E205A43Aトロンピンキュベット及びアンヒドロトロンピンキュベットにそれぞれ100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図18および図14に示す。

図18より24E205A43AトロンピンキュベットにはFVIIIの方がフィブリノゲンより多くの結合が確認された。24E205A43Aは高いFVIII特異性を有している事が確認された。

【0142】

(3) 205A43Aトロンピン及び24E205A43Aトロンピンのトロンボモジュリン親和性の比較
205A43Aトロンピン及び24E205A43Aトロンピン固定化キュベットに対し16.7nM ついで50nMのトロンボモジュリンを加えた。

結合曲線を図19に示す。尚 205A43Aトロンピンは約980arc, 24E205A43Aトロンピンは約1380arcのトロンピン誘導体が固定化されている。

以上の結果より24E205A43Aトロンピンはフィブリノゲンに対しFVIII特異性が高い誘導体でありAPTT延長効果も有していた。さらにはトロンボモジュリン結合能も大きく低下していることより生態に投与した際、本トロンピン変異体が生体内でのトロンピンによるプロテインC 活性化を抑制(阻害)することは無いと考えられる。

【0143】

実験例 2 0

205セリンをアラニンに99アスパラギン酸をアラニンに置換したトロンビン（205A99Aトロンビン）の発現

205A99AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A99Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号41に示す。

205A99Aトロンビンを実験例1の（1）の方法で発現した。実験例1の（2）の方法にエカリンによる活性化を行ったところ、エカリンによるA、B鎖への切断が起こらなかった。

この結果より205A99Aトロンビンをプレトロンビンの形でCHO細胞にて発現した本実験においては2本鎖に活性化された205A99Aトロンビンを得ることはできなかった。

【0144】

[実験例 2 1]

カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビン及びカルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43AトロンビンのAPTTの比較

PBSに溶解した50 μ g/mlのカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビン、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンを以下の2方法でAPTTを測定した。コントロールとしてPBSのみを添加して下記方法a、bにてAPTTを測定した。尚、カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンは残存活性の影響を極力防ぐために合成後、再度APMSF試薬（シグマ社）を2mg/ml添加し不活性化を行い、さらにその後PBSにて十分透析を行い残存APMSF試薬の除去を行った。

【0145】

方法a：標準血漿100 μ lにAPTT試薬50 μ lを加え37℃で5分インキュベーションを行ったものにPBSに溶解した各サンプル100 μ lを加えさらにすばやく0.1M CaCl_2 を12 μ l加えカルシウム添加から凝固までの時間を測定した。

方法b：標準血漿100 μ l PBSに溶解した各サンプル100 μ l及びAPTT試薬50 μ lを加え37℃で5分インキュベーションを行った後0.1M CaCl_2 を12 μ l加えカルシウム添加から凝固までの時間を測定した。

【0146】

結果を以下に示す。

コントロール	方法a	43秒；	方法b	45秒
カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビン	方法a	105秒；	方法b	66秒
カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン	方法a	75秒；	方法b	80秒
205A43Aトロンビン	方法a	67秒；	方法b	77秒
カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン	方法a	145秒；	方法b	170秒

【0147】

以上より、カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンにおいては方法aにて良くAPTTを延長したのに対しカルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンにおいては方法bにて良くAPTTが延長された。またカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンは205A43Aトロンビンよりも同一条件においてAPTT延長効果は高かった。

方法aは標準血漿と各トロンビン誘導体混合物のインキュベーション時間が無いのに対し方法bは標準血漿と各トロンビン誘導体混合物が37℃で5分インキュベーションされる。カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンにおいて方法bでAPTT延長効果が少なくなった理由としてアンヒドロトロンビンから化学的に合成されるアンヒドロトロンビンにおいて極微量に残存するトロンビンの存在を完全に否定できず極わずかなトロンビンが標準血漿と37℃インキュベーションすることで微量の血液凝固因子（特にFVIII）活性化が起き、APTT延長効果を抑制したものと考えられた。一方、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンにおいては遺伝子組み換え技術によって完全に活性を失っているトロンビン誘導体であり、標準血漿とインキュベーションした場合においても血液凝固因子の活性化は起きず、むしろインキュベーションを行った場合の方が平衡化され基質特異性が良く反映され顕著にAPTTを延長した。

以上の考察より、抗血栓剤としてトロンビン誘導体及びそのカルボキシ基修飾誘導体を用いる場合には極微量のトロンビンの混入が考えられるアンヒドロトロンビンを用いるよりも、遺伝子工学的に完全に不活性化され且つ均一な組み換え誘導体から選ばれる適切な薬効を有した本発明で得られる遺伝子組み換えトロンビン及びそのカルボキシ基修飾誘導体の方が安全であり、かつ37℃で少なくとも数時間は存在するvivoでは薬効も高いことが予想される事が示された。

【0148】

実験例22

(1) B鎖77リシンをアラニンに205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(77A205A43Aトロンビン)の発現

77A205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77A205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号43に示す。

77A205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77A205A43A トロンビンが約3mg得られた。

【0149】

(2) 77A205A43A トロンビン50 μ g及び25 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、77A205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ90.5秒、85秒であった。

【0150】

(3) カルボキシ基修飾体のAPTT試験

さらに、1mg/5mlの77A205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4℃で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(和光純薬)を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、77A205A43A トロンビンのカルボキシ基を修飾した。可溶化状態で約85%の修飾体が回収された。

カルボキシ基修飾77A205A43A トロンビン50 μ g及び25 μ gを、PBS 1mlに溶解した溶液100 μ lを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、カルボキシ基修飾77A205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ144、109秒であった。

【0151】

(4) プロトロンビン時間(PT)の測定

77A205A43Aトロンビン及びカルボキシ基修飾77A205A43Aトロンビン50 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは23秒であったのに対し77A205A43Aトロンビンは24秒、カルボキシ基修飾77A205A43AトロンビンのPTは25秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

以上の結果よりB鎖77リシンをアラニンに置換することで置換前に比較しAPTT延長効果が高まった。又、修飾体においても77リジンをアラニンに置換することでAPTT延長効果が増強された。又、B鎖77をグルタミン酸に置換した場合に比べ修飾した場合の回収率の大きな低下は認められなかったことよりB鎖77における修飾の適性はアラニンの方が高

い事が示された。

【0152】

実験例23

(1) B鎖65リシンをアラニンに205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(65A205A43Aトロンビン)の発現

65A205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。65A205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号45に示す。

65A205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された65A205A43A トロンビンが約3mg得られた。

【0153】

(2) 65A205A43A トロンビン50 μ g及び25 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、65A205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ93秒、86秒であった。

【0154】

(3) カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、1mg/5mlの65A205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4℃で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(和光純薬)を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、65A205A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。

カルボキシル基修飾65A205A43A トロンビン50 μ g、25 μ gを、PBS 1mlに溶解した溶液100 μ lを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは41秒であったのに対し、カルボキシル基修飾65A205A43A トロンビンのAPTTはそれぞれ118、88秒であった。

【0155】

(4) プロトロンビン時間(PT)の測定

65A205A43Aトロンビン及びカルボキシル基修飾65A205A43Aトロンビン50 μ gを、PBS 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは23秒であったのに対し65A205A43Aトロンビンは22秒、カルボキシル基修飾65A205A43AトロンビンのPTは25秒でありいずれもPTの延長効果は殆ど示さなかった。

【0156】

(5) PRPを用いた65A205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1:採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100 μ l添加した場合に65A205A43Aトロンビンの終濃度が、100 μ g/mlになるように濃度が調製された、65A205A43AトロンビンのPBS溶液を、100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として5mg/mlリストセチン PBS溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し血小板凝集抑制実験を行ったがコントロールと65A205A43Aトロンビンに違いは無かった。

【0157】

評価2：惹起物質として $1\mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用い65A205A43Aトロンビンの終濃度が、 $100, 50, 25, 10\mu\text{g/ml}$ になるように添加した以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP $130\mu\text{l}$ に、PBS $100\mu\text{l}$ を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図29、30、31に示す。

評価3：惹起物質として $1\mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用い $100\mu\text{l}$ 添加した場合に修飾65A205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ $36, 18, 9, 4.5\mu\text{g/ml}$ になるように濃度が調製された、修飾65A205A43AトロンビンのPBS溶液を加え、評価1の方法に準じて実験を行った。結果を図32、33、34に示す。

評価4：修飾65A205A43Aトロンビンの終濃度が、 $36\mu\text{g/ml}$ になるように濃度が調製された、修飾65A205A43AトロンビンのPBS溶液を、 $100\mu\text{l}$ ずつPRP $130\mu\text{l}$ に添加し、惹起物質として 5mg/ml リストセチン PBS 溶液 $35\mu\text{l}$ を添加した。コントロールとして、PRP $130\mu\text{l}$ に、PBS $100\mu\text{l}$ を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図35に示す。

【0158】

以上の結果より65A205A43Aは205A43Aに比較して高いAPTT延長効果を有し且つより低濃度で強い修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制効果を示した。

【0159】

(6) 65A205A43Aトロンビン及び205A43Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

65A205A43Aトロンビン誘導体及び205A43Aトロンビンの約 0.1mg/ml の濃度の 10mM リン酸緩衝液($\text{pH}7.7$)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、 25°C で攪拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、65A205A43Aトロンビン固定化キュベットを得た。(約 1800arc 結合)引き続き 1M エタノールアミン($\text{pH}8$)を 0.2ml 加えブロッキング処理を行った。65A205A43Aキュベットに 100nM のフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図36に示す。図36より205A43Aトロンビンに比較し65A205A43AキュベットではFVIIIの特異性が高くなっている事が確認された。

【0160】

(7) 205A43Aトロンビン及び65A205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性の比較
65A205A43Aトロンビン固定化キュベットに対し 16.7nM 、ついで 50nM のトロンボモジュリンを加えた。

結合曲線を図37に示す。尚、65A205A43Aトロンビンは約 1800arc 固定化されている。

以上の結果より図19記載の205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン結合能と比較した場合、固定化蛋白量の相対的な比率で換算すると65A205A43Aは約30%にトロンボモジュリン結合能が低下していた。トロンボモジュリン結合能が低下していることより生態に投与した際、65A205A43Aトロンビン変異体が生体内でのトロンビンによるプロテインC活性化の抑制(阻害)が低下していると考えられる。

【産業上の利用可能性】

【0161】

本発明のトロンビン誘導体は、抗血栓剤、抗炎症剤などの医薬として好適に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0162】

【図1】 5mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン($37\mu\text{g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。009がコントロールを、010がカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを示す。縦軸が透過率(%)、横軸が時間(分)を示す(図2-12、15、21-22、25-35も同じ)。

【図2】 $1\mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン($37\mu\text{g/ml}$)の抗血小板効果を示す

図。002がコントロールを、001がカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを示す。

【図3】5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、205A43Aトロンビン ($30 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。079がコントロールを、080が205A43Aトロンビンを示す。

【図4】 $1 \mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、205A43Aトロンビン ($30 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。083がコントロールを、084が205A43Aトロンビンを示す。

【図5】5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($30 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。056がコントロールを、055がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図6】5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($15 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。042がコントロールを、041がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図7】5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($7.5 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。058がコントロールを、057がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図8】 $1 \mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($30 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。064がコントロールを、063がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図9】 $1 \mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($15 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。067がコントロールを、066がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図10】 $1 \mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($7.5 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。070がコントロールを、069がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図11】5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、203A205Gトロンビン ($80 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。104がコントロールを、095が203A205Gトロンビンを示す。

【図12】 $1 \mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、203A205Gトロンビン ($80 \mu\text{g/ml}$) の抗血小板効果を示す図。097がコントロールを、098が203A205Gトロンビンを示す。

【図13】203A205Gトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のフィブリノゲン、実線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のFVIIIを示す。

【図14】アンヒドロトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のフィブリノゲン、実線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のFVIIIを示す。

【図15】 $1 \mu\text{g/ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、205A43Aトロンビン (007; $3.26 \mu\text{M}$ 、008; $0.81 \mu\text{M}$) の抗血小板効果を示す図。009がコントロールを示す。

【図16】205A43Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のフィブリノゲン、実線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のFVIIIを示す。

【図17】205A43Sトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のフィブリノゲン、実線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のFVIIIを示す。

【図18】24E205A43Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のフィブリノゲン、実線が $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ のFVIIIを示す。

【図19】205A43Aトロンビン及び24E205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性を示す図。Dが205A43Aトロンビン、Eが24E205A43Aトロンビンを示す。

【図20】203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を示す電気泳動の図 (写真)。1は分子量マーカー、2, 5は空のレーン、3はFXIIIのみ、4はFXIII+203Aトロンビンを示す。また、レーン6~10はFXIIIに203Aトロンビンを加えてそれぞれ0, 0.5, 1, 3, 6時間反応させたものを示す。

【図 2 1】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 205A トロンビン ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。016 がコントロールを、015 が 203A205G トロンビンを示す。

【図 2 2】 $5\text{mg}/\text{ml}$ リストセチンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 205A トロンビン ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。003 がコントロールを、004 がカルボキシル基修飾 205A トロンビンを示す。

【図 2 3】205A トロンビン誘導体のフィブリノゲン及び FVIII への結合特異性を示す図。破線が $1.0\times 10^{-7}\text{M}$ のフィブリノゲン、実線が $1.0\times 10^{-7}\text{M}$ の FVIII を示す。

【図 2 4】205A203A トロンビン誘導体のフィブリノゲン及び FVIII への結合特異性を示す図。破線が $1.0\times 10^{-7}\text{M}$ のフィブリノゲン、実線が $1.0\times 10^{-7}\text{M}$ の FVIII を示す。

【図 2 5】 $5\text{mg}/\text{ml}$ リストセチンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 77E203A205G トロンビン ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。001 がコントロールを、002 がカルボキシル基修飾 77E203A205G トロンビンを示す。

【図 2 6】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 77E203A205G トロンビン ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。014 がコントロールを、013 がカルボキシル基修飾 77E203A205G トロンビンを示す。

【図 2 7】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、77E205A43A トロンビン ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。019 がコントロールを、020 が 77E205A43A トロンビンを示す。

【図 2 8】 $5\text{mg}/\text{ml}$ リストセチンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 77E205A43A トロンビン ($30\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。005 がコントロールを、006 がカルボキシル基修飾 77E205A43A トロンビンを示す。

【図 2 9】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、65A205A43A トロンビン ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。020 がコントロールを、019 が 65A205A43A トロンビンを示す。

【図 3 0】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、65A205A43A トロンビン (25 または $50\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。021 が $25\mu\text{g}/\text{ml}$ を、022 が $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す。

【図 3 1】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、65A205A43A トロンビン ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。023 がコントロールを、024 が 65A205A43A を示す。

【図 3 2】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビン ($36\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。038 がコントロールを、033 がカルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビンを示す。

【図 3 3】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビン (9 又は $18\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。035 が $18\mu\text{g}/\text{ml}$ を、036 が $9\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す。

【図 3 4】 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビン ($4.5\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。

【図 3 5】 $5\text{mg}/\text{ml}$ リストセチンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビン ($36\mu\text{g}/\text{ml}$) の抗血小板効果を示す図。041 がコントロールを、042 がカルボキシル基修飾 77E205A43A トロンビンを示す。

【図 3 6】65A205A43A トロンビン誘導体のフィブリノゲン及び FVIII への結合特異性を示す図。破線が $1.0\times 10^{-7}\text{M}$ のフィブリノゲン、実線が $1.0\times 10^{-7}\text{M}$ の FVIII を示す。

【図 3 7】65A205A43A トロンビンのトロンボモジュリン親和性を示す図。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Chisso Corporation
FUJIMORI KOGYO Co., Ltd.

<120> トロンピン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物

<130> P-C50037

<150> JP 2004-080950

<151> 2004-03-19

<150> JP 2004-170346

<151> 2004-06-08

<150> JP 2004-217834

<151> 2004-07-26

<150> JP 2004-315631

<151> 2004-10-29

<160> 46

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 927

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(927)

<223>

<400> 1

acc gcc acc agt gag tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc	48
Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly	
1 5 10 15	
tcg gga gag gca gac tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg	96
Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser	
20 25 30	
ctg gag gac aaa acc gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggc	144
Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly	
35 40 45	
cgc att gtg gag ggc tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag	192
Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln	
50 55 60	
gtg atg ctt ttc cgg aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc	240

Val	Met	Leu	Phe	Arg	Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	
65					70					75					80	
ctc	atc	agt	gac	cgc	tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	288
Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	
				85					90					95		
ccg	ccc	tgg	gac	aag	aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	336
Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	
			100					105					110			
ggc	aag	cac	tcc	cgc	aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	384
Gly	Lys	His	Ser	Arg	Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	
		115					120					125				
atg	ttg	gaa	aag	atc	tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	432
Met	Leu	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	
	130					135						140				
ctg	gac	cgg	gac	att	gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	480
Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	
145					150					155					160	
agt	gac	tac	att	cac	cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	528
Ser	Asp	Tyr	Ile	His	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	
				165					170					175		
agc	ttg	ctc	cag	gct	gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	576
Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	
			180					185					190			
ctg	aag	gag	acg	tgg	aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	624
Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	
		195					200					205				
ctg	cag	gtg	gtg	aac	ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	672
Leu	Gln	Val	Val	Asn	Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	
	210					215					220					
tcc	acc	cgg	atc	cgc	atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	720
Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	
225					230					235					240	
cct	gat	gaa	ggg	aaa	cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	agt	ggg	gga	768
Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	
				245					250					255		
ccc	ttt	gtc	atg	aag	agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	816
Pro	Phe	Val	Met	Lys	Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	
			260					265					270			
atc	gtc	tca	tgg	ggg	gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	864
Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	
		275					280					285				
tac	aca	cat	gtg	ttc	cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	912
Tyr	Thr	His	Val	Phe	Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	
	290					295					300					
cag	ttt	gga	gag	tag												927
Gln	Phe	Gly	Glu													
305																

<210> 2

<211> 308

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly
1				5					10					15	
Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser
			20					25					30		
Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly
		35					40					45			
Arg	Ile	Val	Glu	Gly	Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln
	50					55					60				
Val	Met	Leu	Phe	Arg	Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser
65					70					75					80
Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr
			85						90					95	
Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile
			100					105					110		
Gly	Lys	His	Ser	Arg	Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser
		115					120					125			
Met	Leu	Glu	Lys	Ile	Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn
	130					135					140				
Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe
145					150					155					160
Ser	Asp	Tyr	Ile	His	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala
			165						170					175	
Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn
			180					185					190		
Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val
		195					200					205			
Leu	Gln	Val	Val	Asn	Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp
	210					215					220				
Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys
225					230					235					240
Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly
			245						250					255	
Pro	Phe	Val	Met	Lys	Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly
			260					265					270		
Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe
		275					280					285			
Tyr	Thr	His	Val	Phe	Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp
	290					295					300				
Gln	Phe	Gly	Glu												
305															

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
 Gly Asp Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu
 1 5 10

<210> 4
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Arg Arg Pro Glu Ser Lys Ala Thr Asn Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ser
 1 5 10 15
 Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp
 20 25 30
 Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu Thr Glu Tyr Arg Leu Val Ser Ile
 35 40 45
 Asn Lys Ser Ser Pro Leu Gln Lys Gln Leu Pro Ala Phe Ile Ser Glu
 50 55 60
 Asp Ala Ser Gly Tyr Leu Thr Ser Ser
 65 70

<210> 5
 <211> 1056
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 5
 atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30
 caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45
 tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac 192
 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60
 tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc 240
 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80
 gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc 288
 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly

				85				90				95					
t c g	g a t	g c a	g a g	a t c	g g c	a t g	t c a	c c t	t g g	c a g	g t g	a t g	c t t	t t c	c g g	336	
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg		
100				105				110									
a a g	a g t	c c c	c a g	g a g	c t g	c t g	t g t	g g g	g c c	a g c	c t c	a t c	a g t	g a c	c g c	384	
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg		
115				120				125									
t g g	g t c	c t c	a c c	g c c	g c c	c a c	t g c	c t c	c t g	t a c	c c g	c c c	t g g	g a c	a a g	432	
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys		
130				135				140									
a a c	t t c	a c c	g a g	a a t	g a c	c t t	c t g	g t g	c g c	a t t	g g c	a a g	c a c	t c c	c g c	480	
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg		
145				150				155				160					
a c a	a g g	t a c	g a g	c g a	a a c	a t t	g a a	a a g	a t a	t c c	a t g	t t g	g a a	a a g	a t c	528	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile		
165				170				175									
t a c	a t c	c a c	c c c	a g g	t a c	a a c	t g g	c g g	g a g	a a c	c t g	g a c	c g g	g a c	a t t	576	
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile		
180				185				190									
g c c	c t g	a t g	a a g	c t g	a a g	a a g	c c t	g t t	g c c	t t c	a g t	g a c	t a c	a t t	c a c	624	
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His		
195				200				205									
c c t	g t g	t g t	c t g	c c c	g a c	a g g	g a g	a c g	g c a	g c c	a g c	t t g	c t c	c a g	g c t	672	
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
210				215				220									
g g a	t a c	a a g	g g g	c g g	g t g	a c a	g g c	t g g	g g c	a a c	c t g	a a g	g a g	a c g	t g g	720	
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
225				230				235				240					
a c a	g c c	a a c	g t t	g g t	a a g	g g g	c a g	c c c	a g t	g t c	c t g	c a g	g t g	g t g	a a c	768	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
245				250				255									
c t g	c c c	a t t	g t g	g a g	c g g	c c g	g t c	t g c	a a g	g a c	t c c	a c c	c g g	a t c	c g c	816	
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
260				265				270									
a t c	a c t	g a c	a a c	a t g	t t c	t g t	g c t	g g t	t a c	a a g	c c t	g a t	g a a	g g g	a a a	864	
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
275				280				285									
c g a	g g g	g a t	g c c	t g t	g a a	g g t	g a c	a g t	g g g	g g a	c c c	t t t	g t c	a t g	a a g	912	
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
290				295				300									
a g c	c c c	t t t	a a c	a a c	c g c	t g g	t a t	c a a	a t g	g g c	a t c	g t c	t c a	t g g	g g t	960	
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305				310				315				320					
g a a	g g c	t g t	g a c	c g g	g a t	g g g	a a a	t a t	g g c	t t c	t a c	a c a	c a t	g t g	t t c	1008	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
325				330				335									
c g c	c t g	a a g	a a g	t g g	a t a	c a g	a a g	g t c	a t t	g a t	c a g	t t t	g g a	g a g	t a g	1056	
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
340				345				350									

<210> 6
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala		
1				5					10					15			
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln		
			20					25					30				
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
		35					40					45					
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp		
	50					55					60						
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		
65					70					75					80		
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly		
			85					90					95				
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg		
			100					105					110				
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg		
		115				120						125					
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys		
	130					135					140						
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg		
145					150					155					160		
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile		
			165						170					175			
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile		
			180					185					190				
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His		
		195					200					205					
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
	210					215					220						
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
225					230					235					240		
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
			245						250					255			
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
			260					265					270				
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
		275					280					285					
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
	290					295					300						
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
			325						330					335			
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
			340					345					350				

<210> 7
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 7

atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct	48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala	
1 5 10 15	
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag	96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln	
20 25 30	
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag	144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu	
35 40 45	
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac	192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp	
50 55 60	
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc	240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr	
65 70 75 80	
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc	288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly	
85 90 95	
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg	336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg	
100 105 110	
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc	384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg	
115 120 125	
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag	432
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys	
130 135 140	
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc	480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg	
145 150 155 160	
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc	528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile	
165 170 175	
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	576
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile	
180 185 190	
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac	624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His	

195					200					205							
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672	
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
210					215					220							
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720	
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
225					230					235					240		
aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
245					250					255							
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816	
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
260					265					270							
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864	
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
275					280					285							
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	gct	gac	ggg	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912	
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
290					295					300							
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggg	960	
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
325					330					335							
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056	
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
340					345					350							

<210> 8
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45
 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60
 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80
 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
 85 90 95
 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
 100 105 110
 Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg

		115				120				125							
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys		
	130					135					140						
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg		
145					150					155					160		
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile		
			165						170					175			
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile		
			180						185				190				
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His		
	195						200					205					
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
	210					215					220						
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
225					230					235					240		
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
			245						250					255			
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
			260					265					270				
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
	275						280					285					
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
	290					295					300						
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
			325						330					335			
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
		340						345					350				

<210> 9
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400>	9																	
atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct		48	
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala			
1			5					10					15					
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag		96	
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln			
			20					25					30					
caa	gca	cgg	tgc	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag		144	
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu			
	35						40					45						

tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac	192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
50						55					60					
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
				85					90					95		
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agg	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
				165					170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185					190			
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agg	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
				245					250					255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggt	gac	gct	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	

305		310		315		320	
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc							1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe							
	325		330		335		
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag							1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu							
	340		345		350		

<210> 10
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln
			20					25					30		
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu
		35					40					45			
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp
	50					55					60				
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr
65					70					75					80
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly
			85						90					95	
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg
			100					105					110		
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg
		115					120					125			
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys
	130					135					140				
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg
145					150					155					160
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile
			165					170						175	
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile
			180					185					190		
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His
		195					200					205			
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala
	210					215					220				
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp
225					230					235					240
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn
			245					250						255	
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg
		260						265					270		
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys
		275					280						285		

Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys
	290					295					300				
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly
305					310					315					320
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe
				325					330						335
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu	
			340					345					350		

<210> 11
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400>	11	
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct		48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala		
1 5 10 15		
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag		96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln		
20 25 30		
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag		144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu		
35 40 45		
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac		192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp		
50 55 60		
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc		240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr		
65 70 75 80		
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc		288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly		
85 90 95		
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg		336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg		
100 105 110		
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc		384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg		
115 120 125		
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag		432
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys		
130 135 140		
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc		480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg		
145 150 155 160		

aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165						170						175	
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180						185						190	
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195						200							205	
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
		210						215							220	
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225						230					235				240	
aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245							250					255	
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260							265					270	
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
			275												285	
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	act	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
		290													300	
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggg	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305						310									320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
						325									335	
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340												350	

<210> 12
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45
 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp

50						55						60				
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85						90					95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100						105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115						120					125			
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165						170					175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
		180						185					190			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
	195						200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215						220				
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245						250					255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
		260						265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
	275						280					285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305				310						315					320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
		340						345					350			

<210> 13
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 13
 atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5				10						15		
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag	96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag	144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac	192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85					90					95			
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165					170					175			
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	aac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asn	Ile	
			180					185				190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245					250					255			
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			

atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	gct	gac	gct	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
		340						345					350			

<210> 14
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5					10					15		
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85						90					95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100						105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165						170					175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asn	Ile	
		180						185				190				
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
	195						200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210						215					220				

Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235						240
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
				245					250						255	
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305				310						315					320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325					330						335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
		340						345					350			

<210> 15
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 15	
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct	48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala	
1 5 10 15	
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag	96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln	
20 25 30	
caa gca cgg tgc ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag	144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu	
35 40 45	
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tgc gga gag gca gac	192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp	
50 55 60	
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tgc ctg gag gac aaa acc	240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr	
65 70 75 80	
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc	288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly	
85 90 95	
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg	336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg	
100 105 110	
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc	384

Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165						170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185				190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
	195						200					205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245					250						255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265				270				
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	gtt	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggg	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345				350				

<210> 16
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5				10						15		
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75				80		
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85					90					95			
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165					170						175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185					190			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245						250					255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

<210> 17

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 17
 atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30
 caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45
 tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tgc gga gag gca gac 192
 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60
 tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tgc ctg gag gac aaa acc 240
 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80
 gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc 288
 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
 85 90 95
 tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg 336
 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
 100 105 110
 aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc 384
 Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
 115 120 125
 tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag 432
 Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
 130 135 140
 aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc 480
 Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
 145 150 155 160
 aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc 528
 Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
 165 170 175
 tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att 576
 Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
 180 185 190
 gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac 624
 Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
 195 200 205
 cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct 672
 Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
 210 215 220
 gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg 720

Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235						240
aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245						250					255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	gat	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Asp	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggg	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

<210> 18
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1			5					10						15		
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35				40						45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50				55						60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85					90						95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100						105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	

Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
				165					170					175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185					190			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245						250					255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
	275					280						285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Asp	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

<210> 19
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400>	19																
atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct		48
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala		
1			5						10					15			
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag		96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln		
			20					25					30				
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag		144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
		35				40					45						
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac		192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp		
	50					55				60							
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc		240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		

65						70						75						80	
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288			
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly				
					85						90						95		
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336			
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg				
					100						105						110		
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg				
					115						120						125		
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432			
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys				
					130						135						140		
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480			
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg				
					145						150						155	160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528			
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile				
					165						170						175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576			
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile				
					180						185						190		
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His				
					195						200						205		
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672			
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala				
					210						215						220		
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720			
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp				
					225						230						235	240	
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768			
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn				
					245						250						255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816			
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg				
					260						265						270		
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys				
					275						280						285		
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggt	gac	aat	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912			
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Asn	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys				
					290						295						300		
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960			
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly				
					305						310						315	320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008			
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe				
					325						330						335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056			

Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu
			340					345					350	

<210> 20
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala
1			5					10					15		
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln
			20					25					30		
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu
		35					40					45			
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp
	50					55					60				
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr
65					70					75				80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly
			85					90						95	
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg
			100					105					110		
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg
		115					120						125		
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys
	130					135						140			
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg
145					150					155					160
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile
			165					170						175	
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile
			180					185					190		
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His
		195					200					205			
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala
	210					215						220			
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp
225					230					235					240
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn
			245						250					255	
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg
			260					265					270		
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys
		275					280					285			
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Asn	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys
	290					295					300				
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly
305					310					315					320
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe

325
330
335
 A r g L e u L y s L y s T r p I l e G l n L y s V a l I l e A s p G l n P h e G l y G l u
340
345
350

			180					185					190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac		624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His		
		195					200					205					
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct		672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
	210					215					220						
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg		720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
225					230					235					240		
aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac		768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
			245					250						255			
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc		816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
		260					265				270						
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa		864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
		275				280					285						
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	gct	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag		912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
	290					295					300						
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggg		960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc		1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
			325						330					335			
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag		1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
		340						345					350				

<210> 22
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45
 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60
 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80
 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
 85 90 95

caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag	144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
	35						40					45				
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac	192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85						90					95		
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100						105					110			
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165						170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
		180						185					190			
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
	195						200					205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245						250					255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
		260						265					270			
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
	275						280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	gct	gac	gct	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	

290		295		300	
agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt	960				
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly					
305	310	315	320		
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc	1008				
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe					
	325	330	335		
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag	1056				
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu					
	340	345	350		

<210> 24
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln
			20					25					30		
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu
		35					40					45			
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp
	50					55					60				
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr
65					70					75					80
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly
			85						90					95	
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg
			100					105					110		
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg
		115					120					125			
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys
	130					135					140				
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg
145					150					155					160
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile
			165						170					175	
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile
			180					185					190		
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His
		195					200					205			
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala
	210					215					220				
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp
225					230					235					240
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn
			245						250					255	
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg

			260					265					270				
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
		275					280					285					
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
	290					295					300						
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
			325					330						335			
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
			340					345					350				

<210> 25
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400>	25																
atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct		48
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala		
1			5					10					15				
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag		96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln		
			20					25					30				
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag		144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
			35				40					45					
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac		192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp		
	50				55					60							
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc		240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		
65					70			75						80			
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc		288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly		
			85					90					95				
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg		336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg		
			100					105					110				
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc		384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg		
			115				120					125					
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	gcc	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag		432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys		
	130						135					140					

aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc	480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg	
145 150 155 160	
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc	528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile	
165 170 175	
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	576
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile	
180 185 190	
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac	624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His	
195 200 205	
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct	672
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala	
210 215 220	
gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg	720
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp	
225 230 235 240	
aca gcc aac gtt ggt aag ggg cag ccc agt gtc ctg cag gtg gtg aac	768
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn	
245 250 255	
ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc	816
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg	
260 265 270	
atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa	864
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys	
275 280 285	
cga ggg gat gcc tgt gaa ggg gac gcc ggg gga ccc ttt gtc atg aag	912
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys	
290 295 300	
agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt	960
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly	
305 310 315 320	
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc	1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe	
325 330 335	
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag	1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu	
340 345 350	

<210> 26
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30

Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85						90					95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100						105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
	115						120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145				150						155					160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165					170						175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
		180						185				190				
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
	195						200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245						250					255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
		260						265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
	275						280					285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305				310						315					320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
		340						345					350			

<210> 27
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct	48
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1			5						10					15		
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag	96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag	144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac	192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85						90					95		
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105						110		
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	gaa	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165						170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185					190			
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc			

ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggc	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
			275					280					285			
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	gct	gac	ggg	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290						295				300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggc	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
				325					330					335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

<210> 28
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5					10					15		
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
				85					90					95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135						140				
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
				165					170					175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185					190			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	

<400> 29																	
atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct	48	
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala		
				5							10						15
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag	96	
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln		
				20							25						30
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag	144	
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
				35							40						45
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac	192	
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp		
				50							55						60
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240	
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		
				65							70						75
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly		
				85							90						95
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336	

Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	gaa	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165					170					175			
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	aac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asn	Ile	
			180					185				190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215						220				
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245					250					255			
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265				270				
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggc	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	gct	gac	gct	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggc	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325					330					335			
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

<210> 30

<211> 351

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5					10					15		
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85						90					95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100						105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165						170					175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asn	Ile	
		180						185					190			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245						250					255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
		260						265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

<210> 31

<211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 31

atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct	48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala	
1 5 10 15	
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag	96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln	
20 25 30	
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag	144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu	
35 40 45	
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tgc gga gag gca gac	192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp	
50 55 60	
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc	240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr	
65 70 75 80	
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc	288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly	
85 90 95	
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg	336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg	
100 105 110	
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc	384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg	
115 120 125	
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag	432
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys	
130 135 140	
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc	480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg	
145 150 155 160	
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc	528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile	
165 170 175	
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	576
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile	
180 185 190	
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac	624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His	
195 200 205	
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct	672

Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
				245					250					255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	gct	gac	agt	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggg	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
				325					330					335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

<210> 32
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5					10					15		
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35				40						45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
				85					90					95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	

130	135	140	
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg			
145	150	155	160
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile			
	165	170	175
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile			
	180	185	190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His			
	195	200	205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala			
	210	215	220
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp			
225	230	235	240
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn			
	245	250	255
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg			
	260	265	270
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys			
	275	280	285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys			
	290	295	300
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly			
305	310	315	320
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe			
	325	330	335
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu			
	340	345	350

<210> 33
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 33	
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct	48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala	
1 5 10 15	
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag	96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln	
20 25 30	
caa gca cgg tgc ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag	144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu	
35 40 45	
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tgc gga gag gca gac	192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp	

50					55					60						
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
85					90					95						
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
100					105					110						
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
115					120					125						
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	gcc	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
130					135					140						
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
165					170					175						
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
180					185					190						
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
195					200					205						
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
210					215					220						
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
245					250					255						
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
260					265					270						
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
275					280					285						
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	ggg	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
290					295					300						
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggg	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008

Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
				325					330					335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

1056

<210> 34
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400>	34															
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1			5					10						15		
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			20					25					30			
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35				40						45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50				55						60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75				80		
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85					90					95			
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145				150						155					160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165					170						175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185					190			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225				230						235					240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245					250						255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					

Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly
305					310					315					320
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe
				325					330					335	
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu	
			340					345					350		

<210> 35
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400>	35																
atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct		48
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala		
1				5					10					15			
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag		96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln		
			20					25					30				
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag		144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
		35				40						45					
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac		192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp		
	50				55					60							
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc		240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		
65				70					75					80			
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc		288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly		
			85					90					95				
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg		336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg		
		100						105					110				
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc		384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg		
		115					120					125					
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	tcc	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag		432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ser	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys		
	130					135					140						
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc		480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg		
145				150					155					160			
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc		528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile		

				165				170					175				
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att		576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile		
			180					185					190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac		624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His		
		195					200					205					
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct		672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
	210						215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg		720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
225					230					235					240		
aca	gcc	aac	gtt	ggc	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac		768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
			245					250					255				
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc		816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
		260						265					270				
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggc	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa		864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
		275					280					285					
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	gcc	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag		912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
	290						295				300						
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggc		960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc		1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
			325					330					335				
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag		1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
		340						345					350				

<210> 36
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45
 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60
 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr

65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
				85					90					95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ser	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145				150					155						160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165					170					175			
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180				185					190				
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
	195						200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210				215						220					
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225				230					235						240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245					250						255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
		260						265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
	275					280						285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290				295						300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305				310					315						320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325					330					335			
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
		340					345					350				

<210> 37
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400>	37															
atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct	
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1				5				10					15			

gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag	96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
		20						25					30			
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag	144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35					40					45				
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac	192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55				60						
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85					90					95			
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100						105					110			
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	gcc	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	gag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165					170					175			
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185					190			
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200						205			
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245					250					255			
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	

275					280					285							
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	gcc	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912	
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
290					295					300							
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggc	960	
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
325					330					335							
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056	
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
340					345					350							

Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
				245					250					255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325					330						335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345					350			

<210> 39
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400>	39	
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct		48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala		
1 5 10 15		
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag		96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln		
20 25 30		
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag		144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu		
35 40 45		
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac		192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp		
50 55 60		
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc		240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr		
65 70 75 80		
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc		288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly		
85 90 95		
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg		336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg		
100 105 110		
aag agt ccc gag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc		384
Lys Ser Pro Glu Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg		
115 120 125		

tgg gtc ctc acc gcc gcc gcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag	432
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys	
130 135 140	
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc	480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg	
145 150 155 160	
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc	528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile	
165 170 175	
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	576
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile	
180 185 190	
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac	624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His	
195 200 205	
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct	672
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala	
210 215 220	
gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg	720
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp	
225 230 235 240	
aca gcc aac gtt ggt aag ggg cag ccc agt gtc ctg cag gtg gtg aac	768
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn	
245 250 255	
ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc	816
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg	
260 265 270	
atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa	864
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys	
275 280 285	
cga ggg gat gcc tgt gaa ggg gac gcc ggg gga ccc ttt gtc atg aag	912
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys	
290 295 300	
agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt	960
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly	
305 310 315 320	
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc	1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe	
325 330 335	
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag	1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu	
340 345 350	

<210> 40
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala

1				5					10					15			
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln		
			20					25					30				
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
		35					40					45					
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp		
	50					55					60						
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		
65					70					75					80		
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly		
				85				90					95				
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg		
			100					105					110				
Lys	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg		
		115					120					125					
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys		
	130					135					140						
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg		
145					150					155					160		
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile		
				165					170						175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile		
			180					185					190				
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His		
		195					200					205					
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
	210					215					220						
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
225					230					235					240		
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
				245					250						255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
			260					265					270				
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
		275					280					285					
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
	290					295					300						
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
				325					330					335			
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
			340					345					350				

<210> 41
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 41

atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct	48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala	
1 5 10 15	
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag	96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln	
20 25 30	
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag	144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu	
35 40 45	
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac	192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp	
50 55 60	
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc	240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr	
65 70 75 80	
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc	288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly	
85 90 95	
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg	336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg	
100 105 110	
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc	384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg	
115 120 125	
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag	432
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys	
130 135 140	
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc	480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg	
145 150 155 160	
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc	528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile	
165 170 175	
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gcc att	576
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Ala Ile	
180 185 190	
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac	624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His	
195 200 205	
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct	672
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala	
210 215 220	
gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg	720
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp	
225 230 235 240	

aca gcc aac gtt ggt aag ggg cag ccc agt gtc ctg cag gtg gtg aac	768
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn	
245 250 255	
ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc	816
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg	
260 265 270	
atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa	864
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys	
275 280 285	
cga ggg gat gcc tgt gaa ggt gac gct ggg gga ccc ttt gtc atg aag	912
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys	
290 295 300	
agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt	960
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly	
305 310 315 320	
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc	1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe	
325 330 335	
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag	1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu	
340 345 350	

<210> 42
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42	
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala	
1 5 10 15	
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln	
20 25 30	
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu	
35 40 45	
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp	
50 55 60	
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr	
65 70 75 80	
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly	
85 90 95	
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg	
100 105 110	
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg	
115 120 125	
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys	
130 135 140	
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg	
145 150 155 160	
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile	
165 170 175	

Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Ala	Ile	
			180					185					190			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215						220				
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245						250					255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
		260						265					270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
	275						280					285				
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295					300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325						330					335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
		340						345					350			

<210> 43
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400>	43																
atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct		48
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala		
1			5					10					15				
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag		96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln		
			20					25					30				
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag		144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
			35				40					45					
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	cag	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac		192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp		
	50					55					60						
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc		240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		
65					70					75					80		
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc		288

Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
				85					90					95		
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
			100					105					110			
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	gcc	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150				155						160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	gcc	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Ala	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165					170					175			
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
			180					185				190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210					215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225				230				235					240			
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245					250					255			
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
			260					265				270				
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	gcc	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290					295				300						
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305				310				315						320		
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325					330					335			
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
			340					345				350				

<210> 44
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala		
1				5					10					15			
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln		
			20					25					30				
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu		
		35					40					45					
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp		
	50					55					60						
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		
65					70					75					80		
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly		
			85						90					95			
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg		
			100					105						110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg		
		115					120							125			
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys		
	130					135						140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg		
145					150					155					160		
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Ala	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile		
			165						170					175			
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile		
			180					185					190				
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His		
		195					200					205					
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
	210					215						220					
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
225					230					235					240		
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
			245						250					255			
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
			260					265					270				
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
		275					280					285					
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
	290					295					300						
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
305					310					315					320		
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe		
			325						330					335			
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			

<210> 45
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 45
 atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30
 caa gca cgg tgc ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45
 tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tgc gga gag gca gac 192
 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60
 tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tgc ctg gag gac aaa acc 240
 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80
 gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc 288
 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
 85 90 95
 tgc gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg 336
 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
 100 105 110
 aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc 384
 Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
 115 120 125
 tgg gtc ctc acc gcc gcc gcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag 432
 Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
 130 135 140
 aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc gcc cac tcc cgc 480
 Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Ala His Ser Arg
 145 150 155 160
 aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc 528
 Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
 165 170 175
 tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att 576
 Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
 180 185 190
 gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac 624

Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
		195					200					205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
		210				215					220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
aca	gcc	aac	gtt	ggg	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
			245					250						255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
		260						265					270			
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggg	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		275					280					285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	gcc	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
		290				295					300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggg	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305					310					315					320	
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
			325					330					335			
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
		340						345					350			

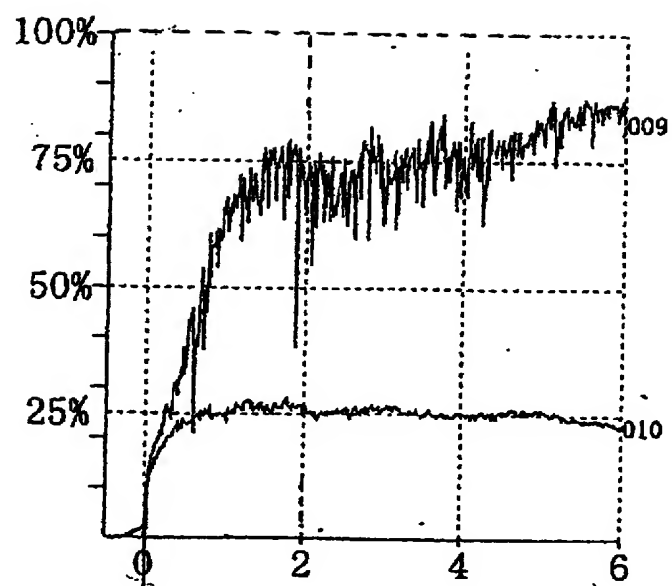
<210> 46
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400>	46															
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1			5					10					15			
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
		20						25				30				
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		35				40						45				
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	50					55					60					
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75					80	
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
			85					90					95			
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100						105					110			

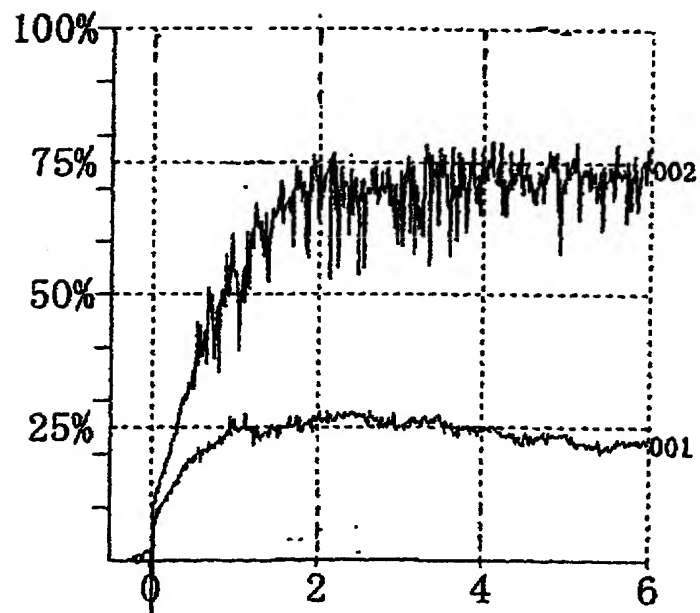
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					140					
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Ala	His	Ser	Arg	
145				150					155						160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
			165				170							175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
		180					185					190				
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
	195					200						205				
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	210				215						220					
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225			230				235								240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
		245					250							255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
	260						265					270				
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
	275				280						285					
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
	290				295						300					
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
305			310				315								320	
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
		325					330							335		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
		340					345					350				

【書類名】 図面

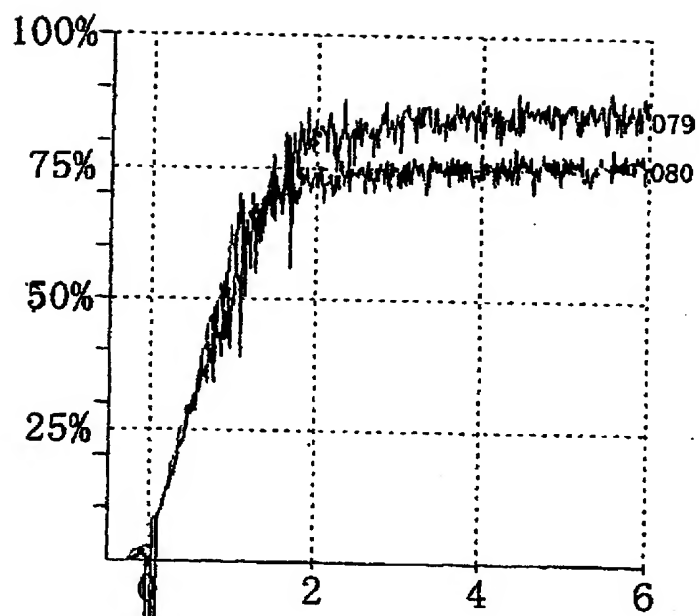
【図 1】



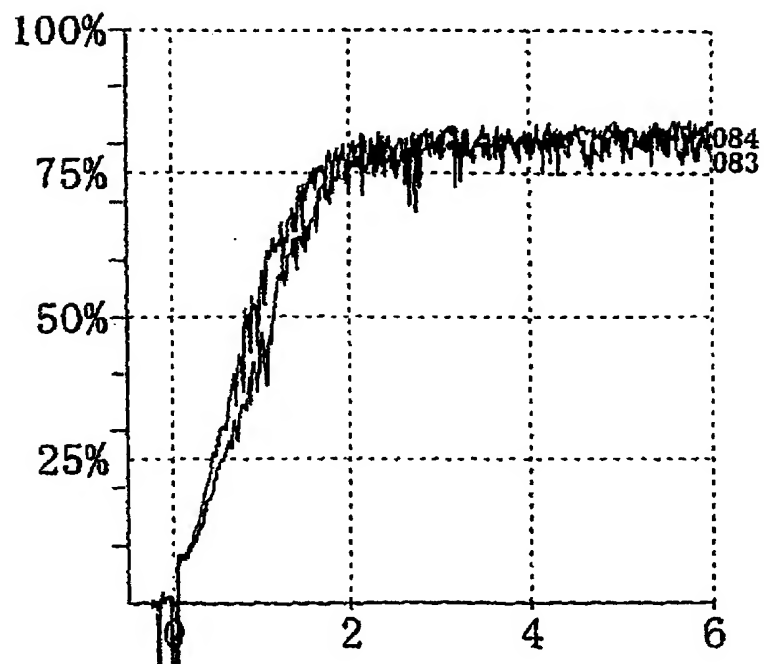
【図 2】



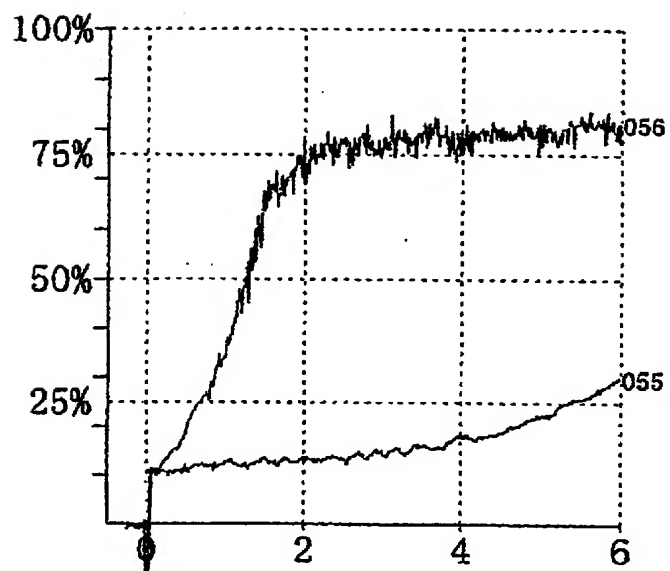
【 図 3 】



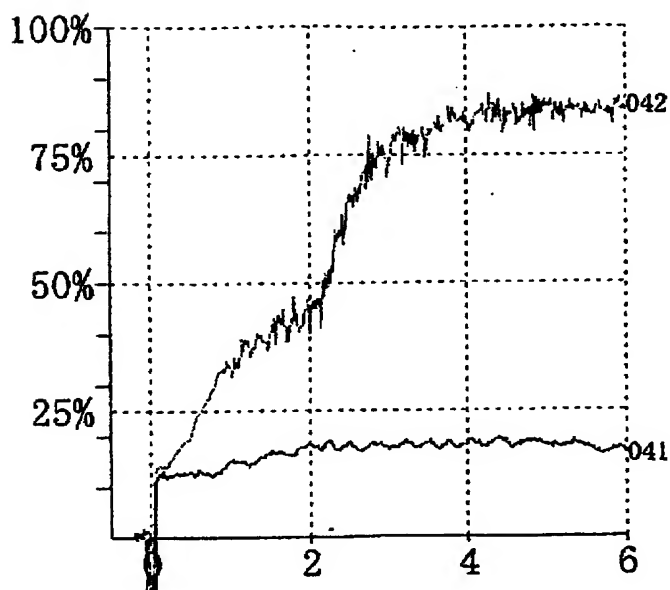
【 図 4 】



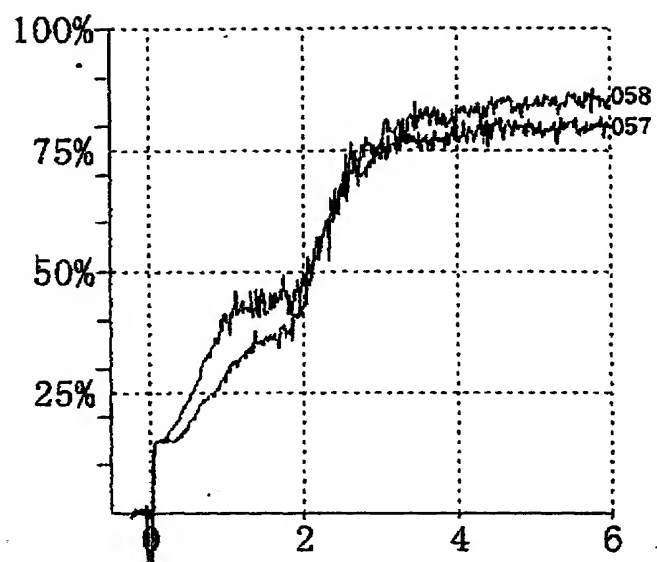
【 図 5 】



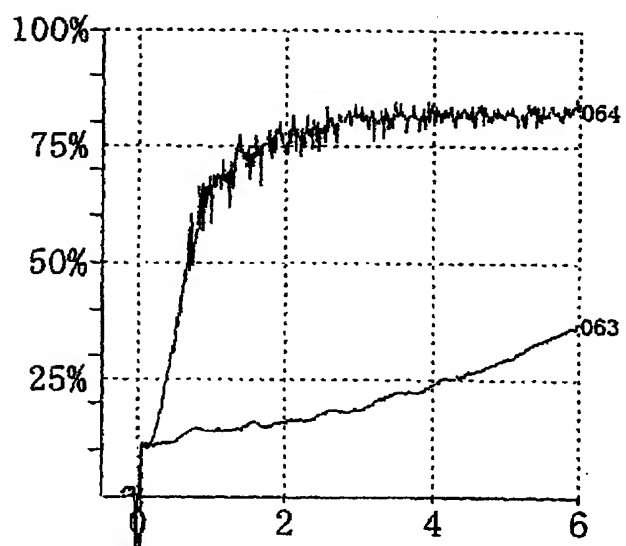
【 図 6 】



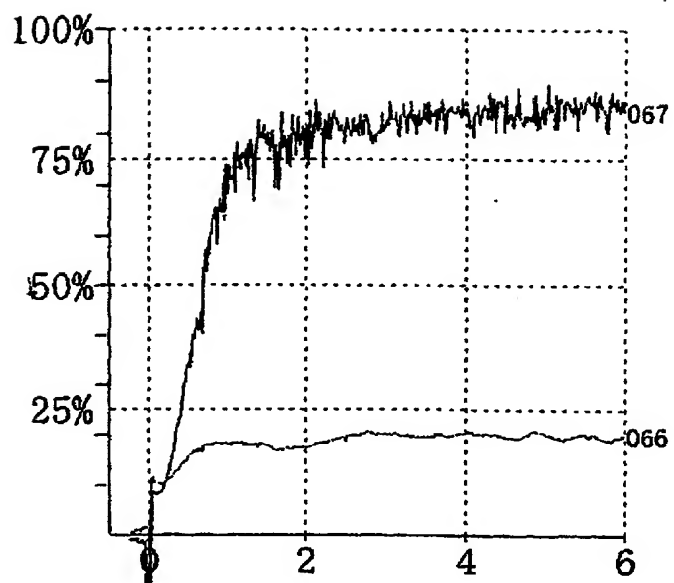
【图 7】



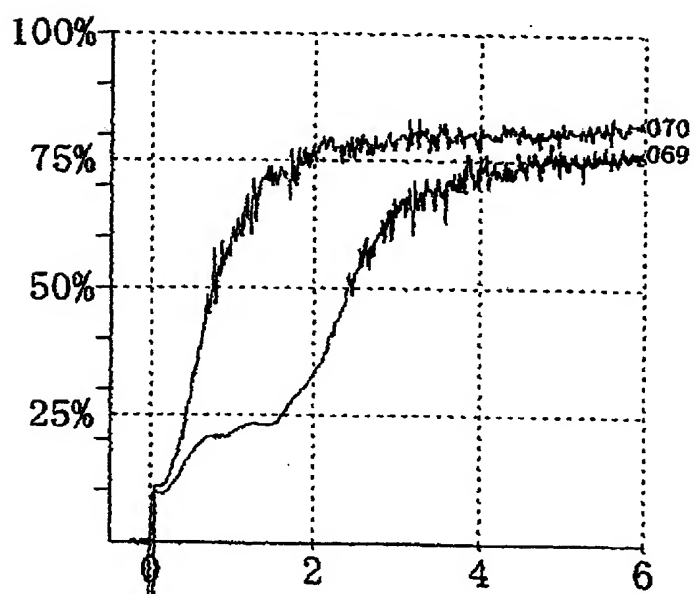
【图 8】



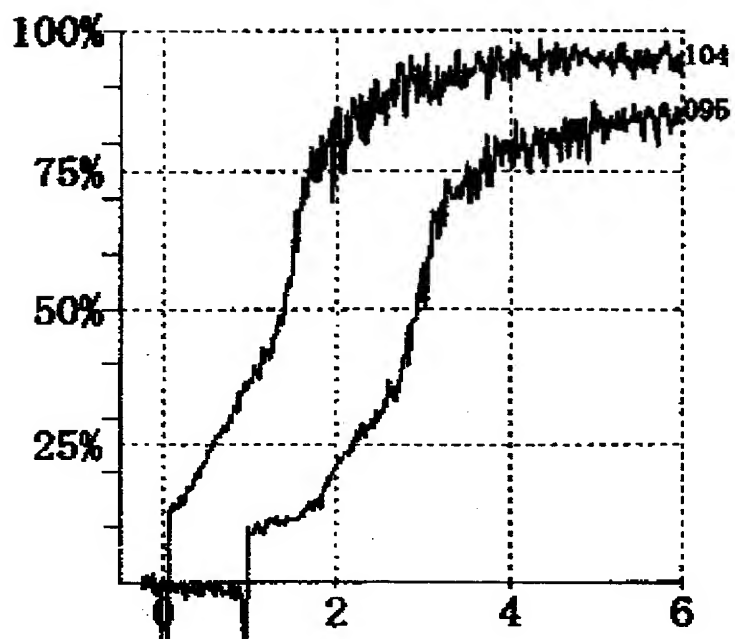
【 図 9 】



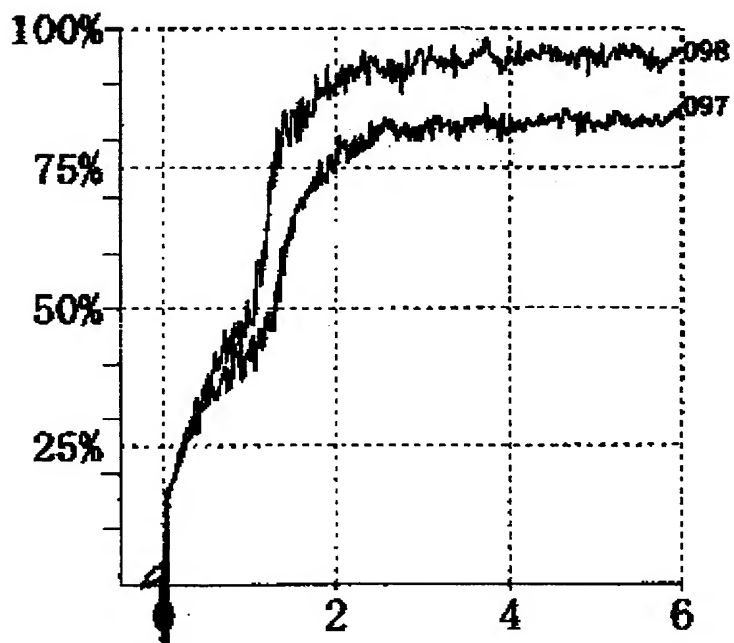
【 図 1 0 】



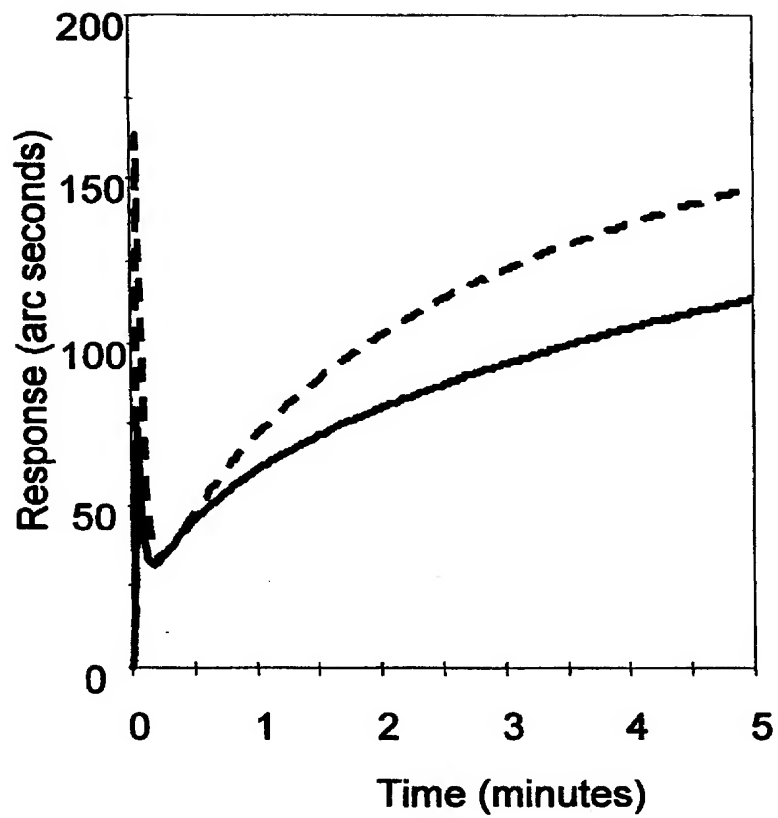
【图 1 1】



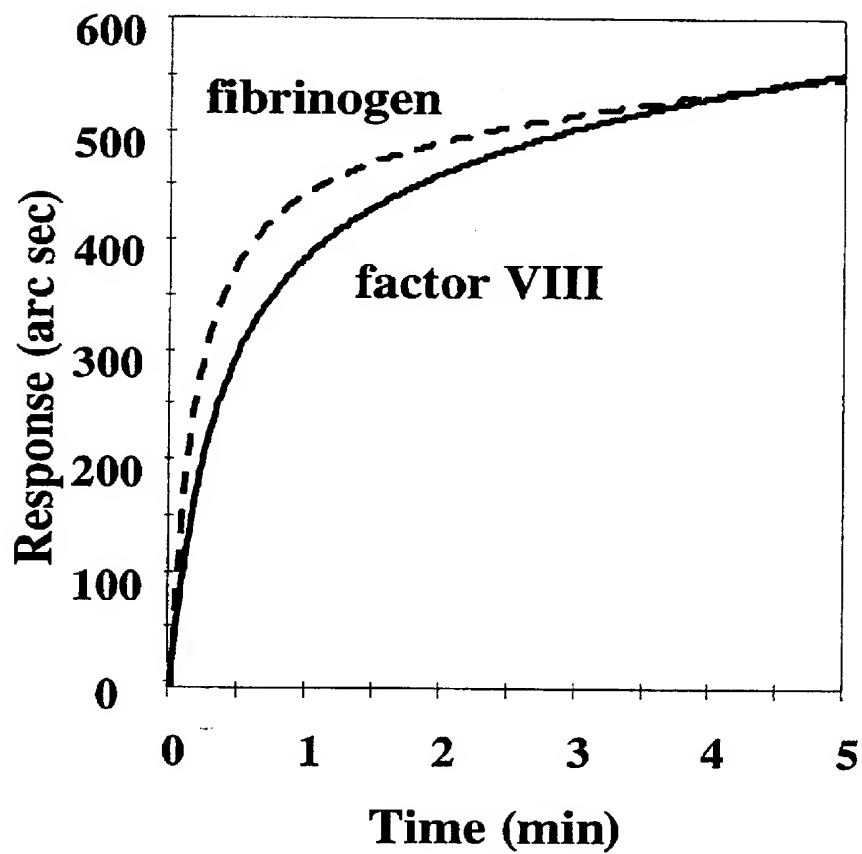
【图 1 2】

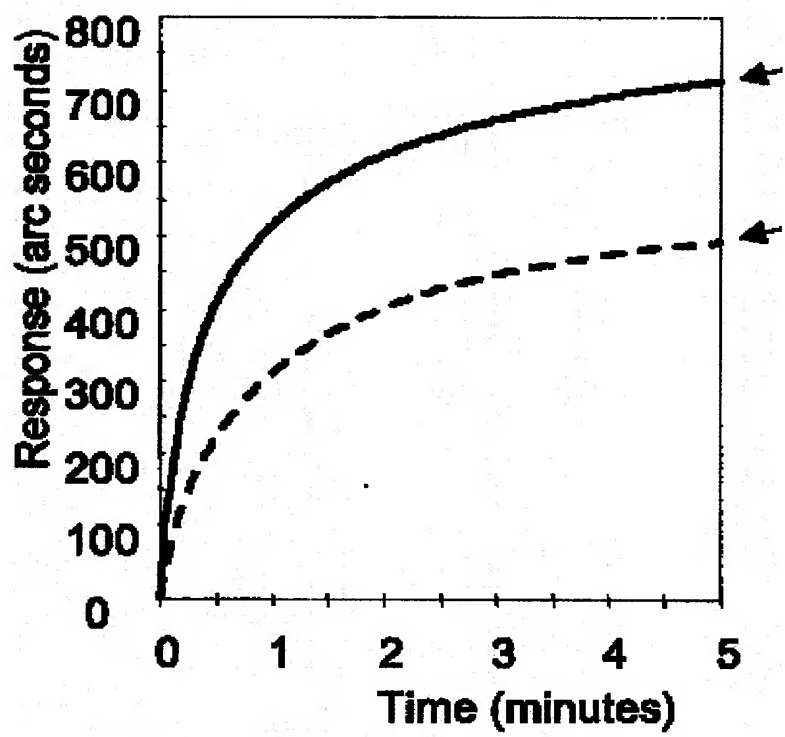
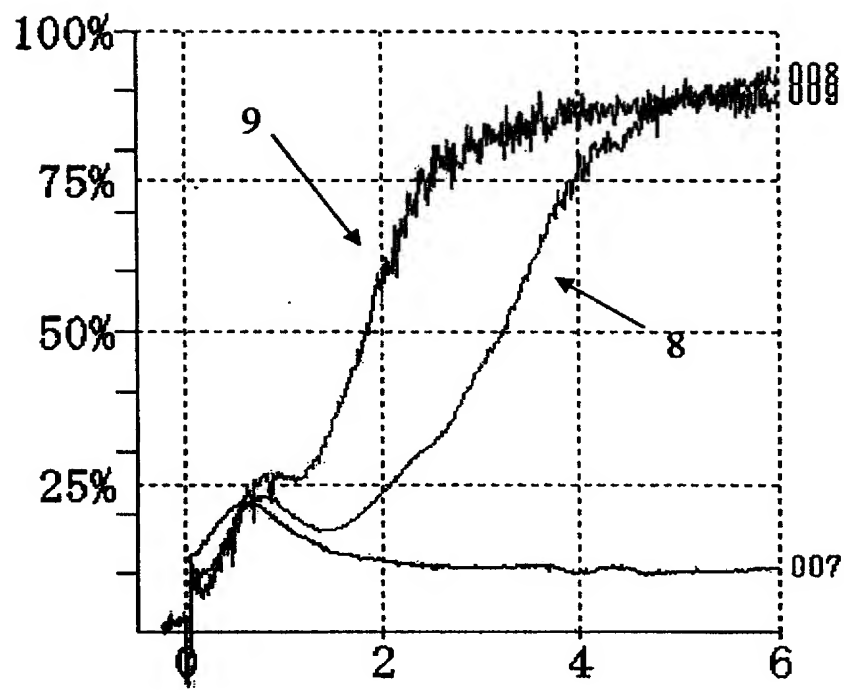


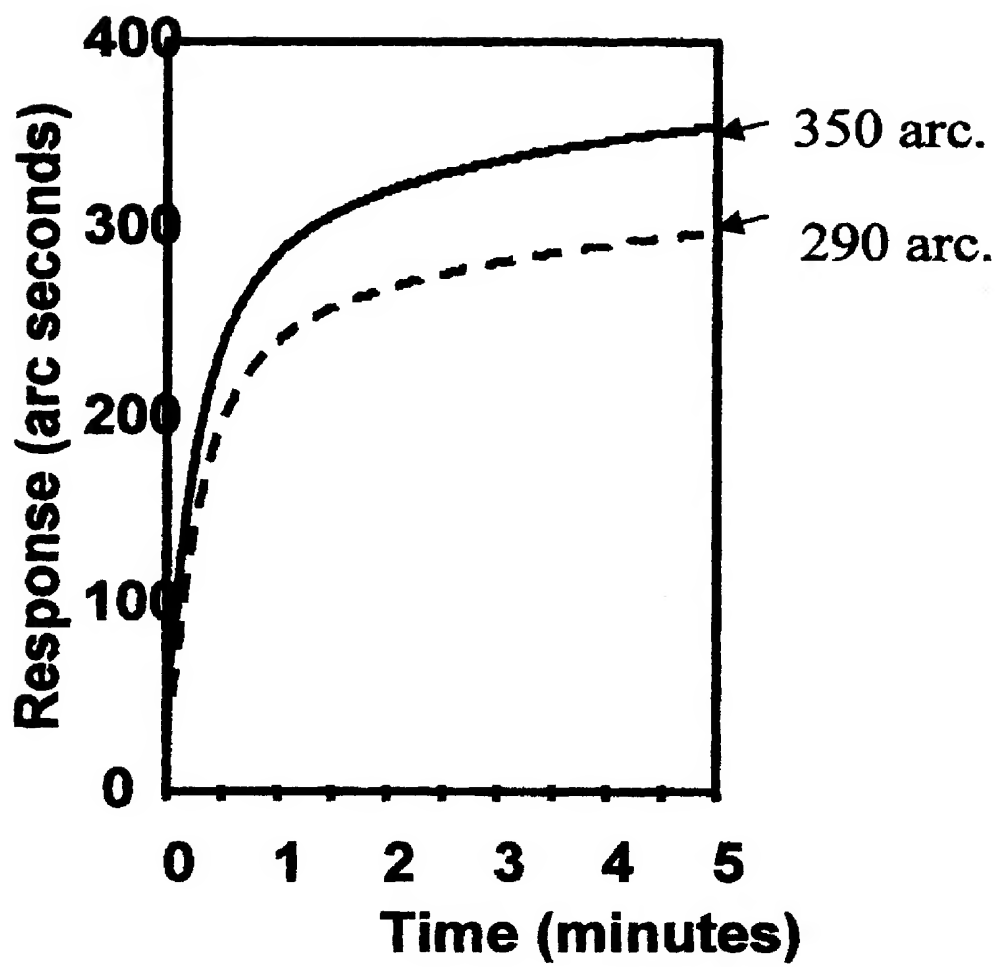
【 図 1 3 】

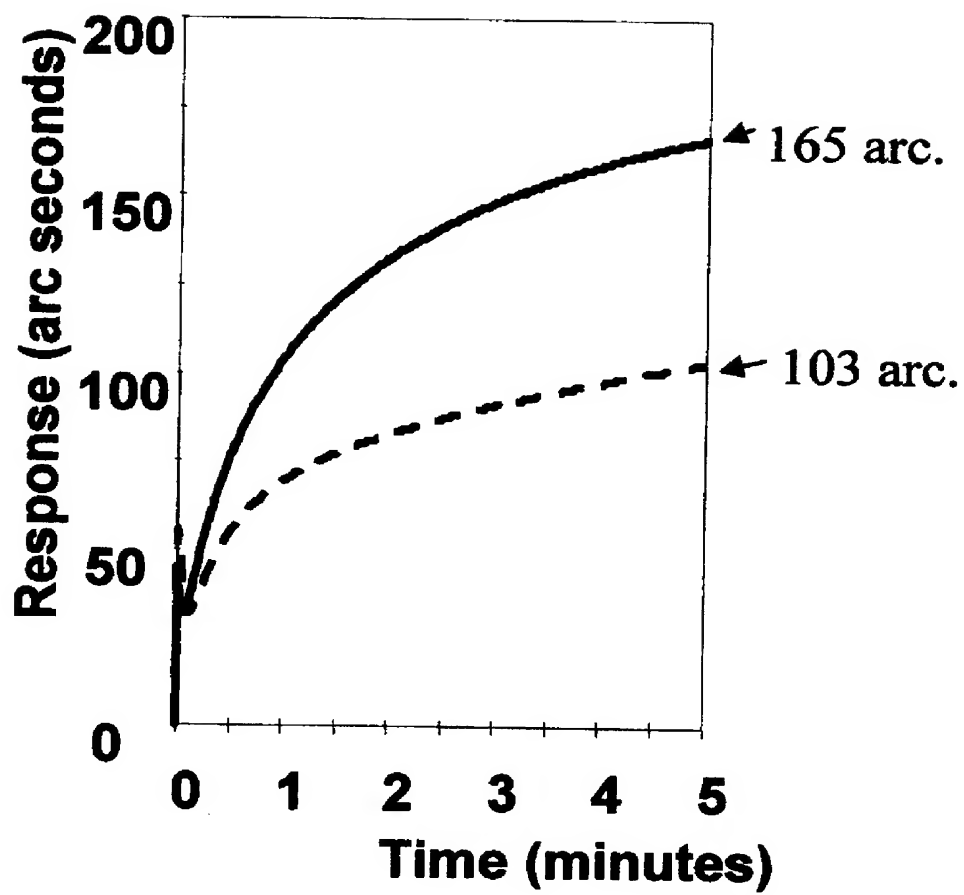


【 図 1 4 】

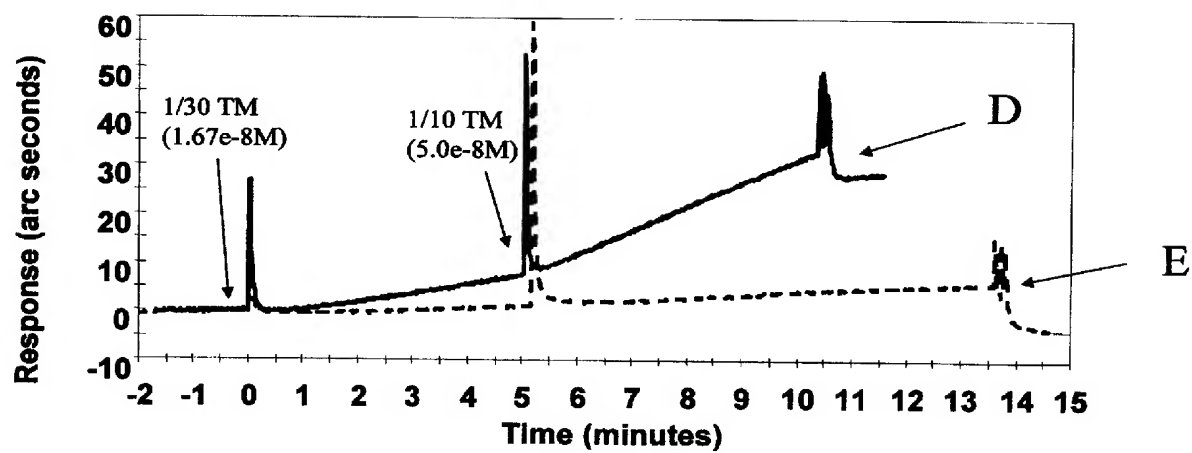




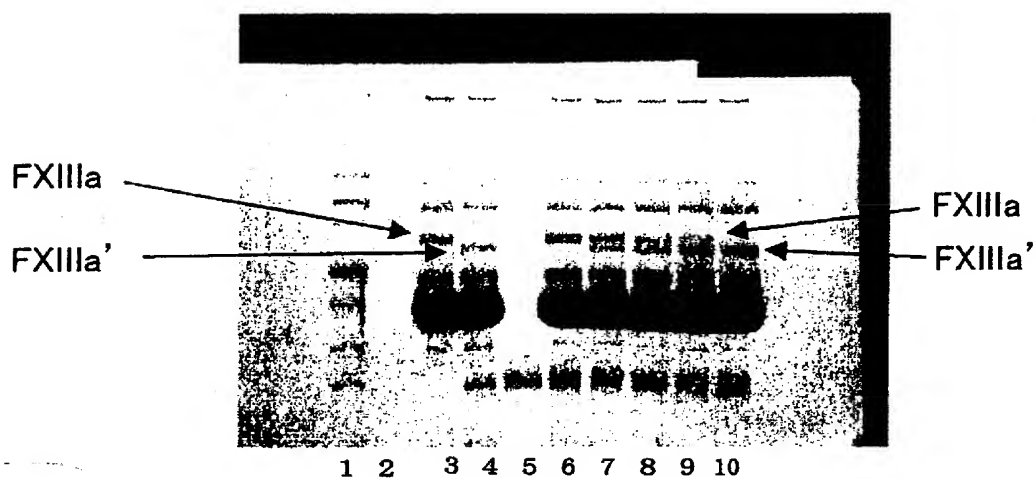




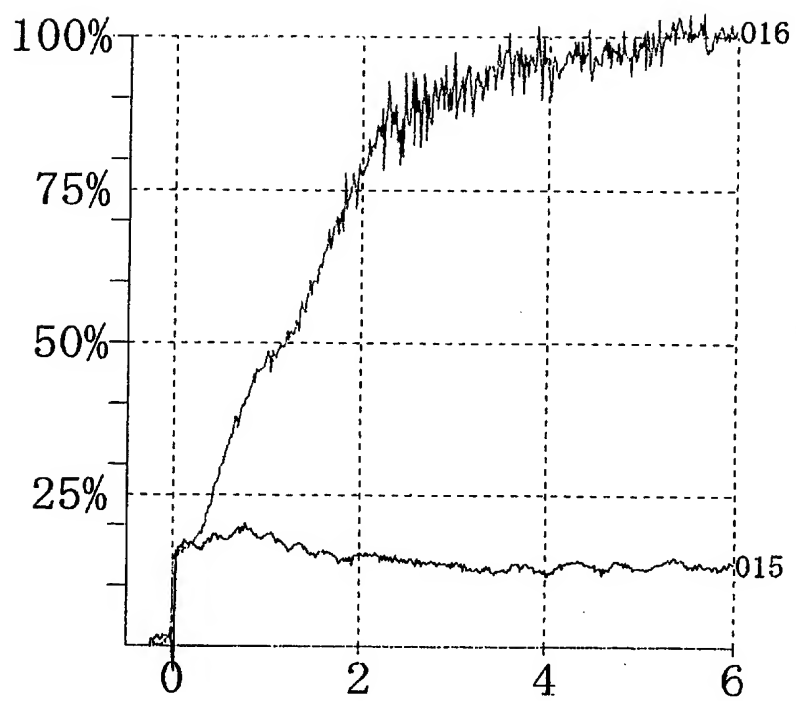
【 図 1 9 】



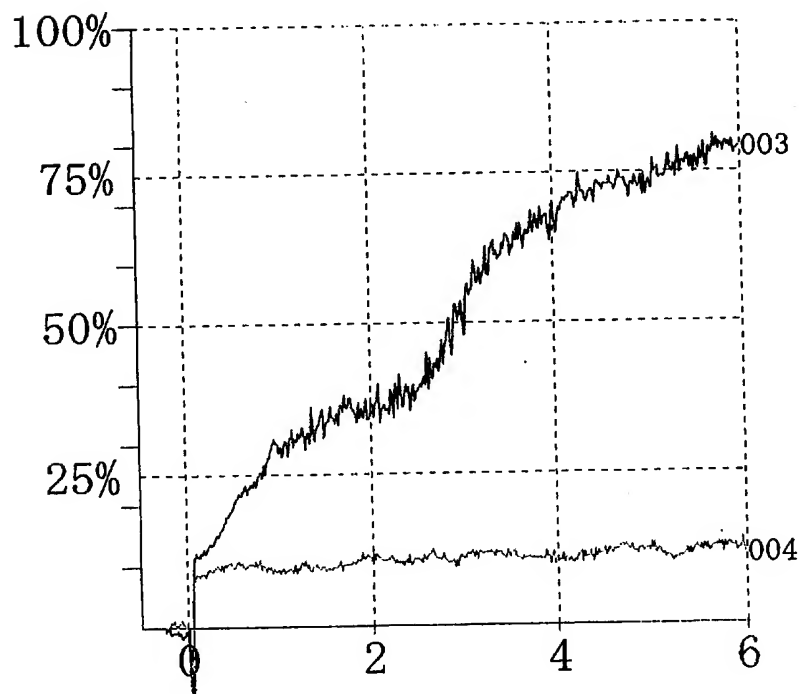
【 図 2 0 】



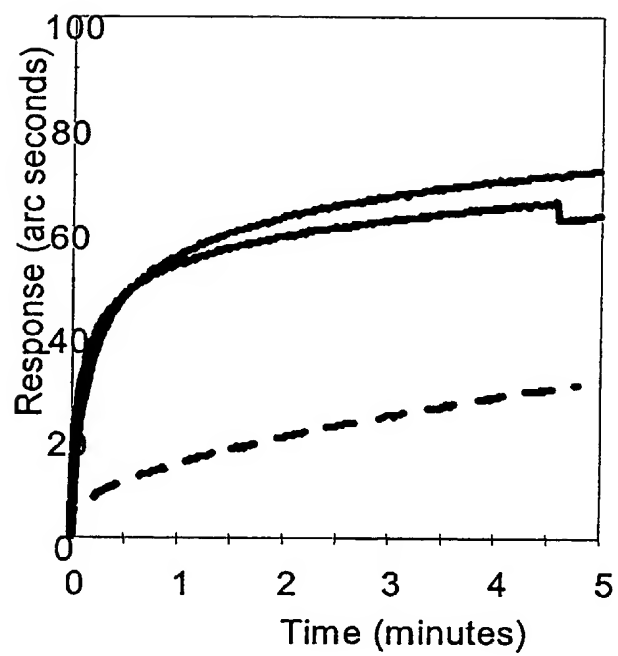
【图 2 1】



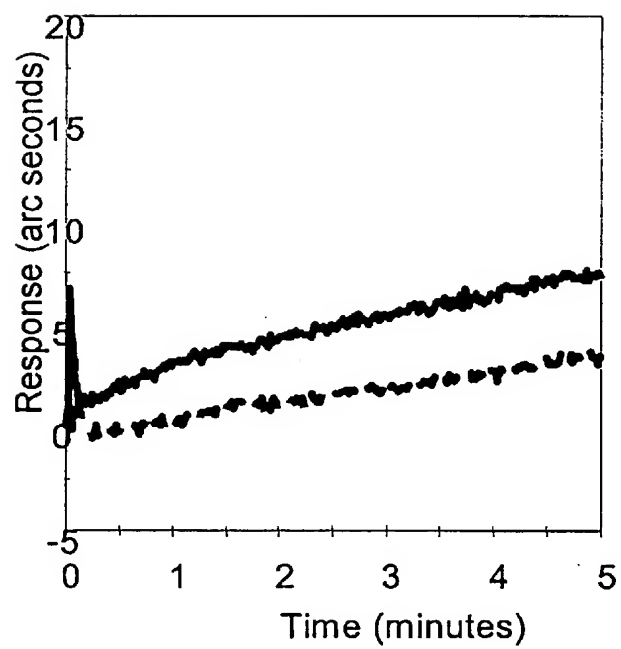
【图 2 2】



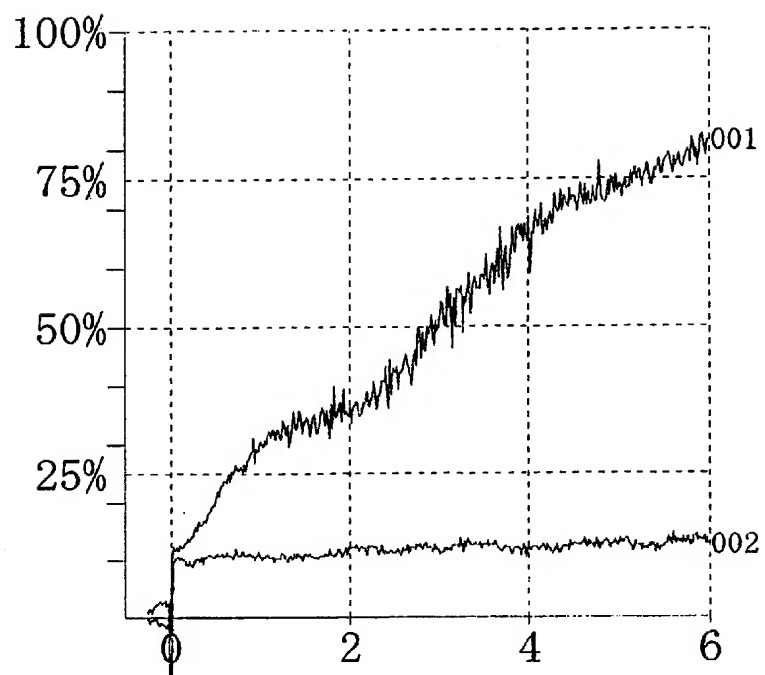
【 図 2 3 】



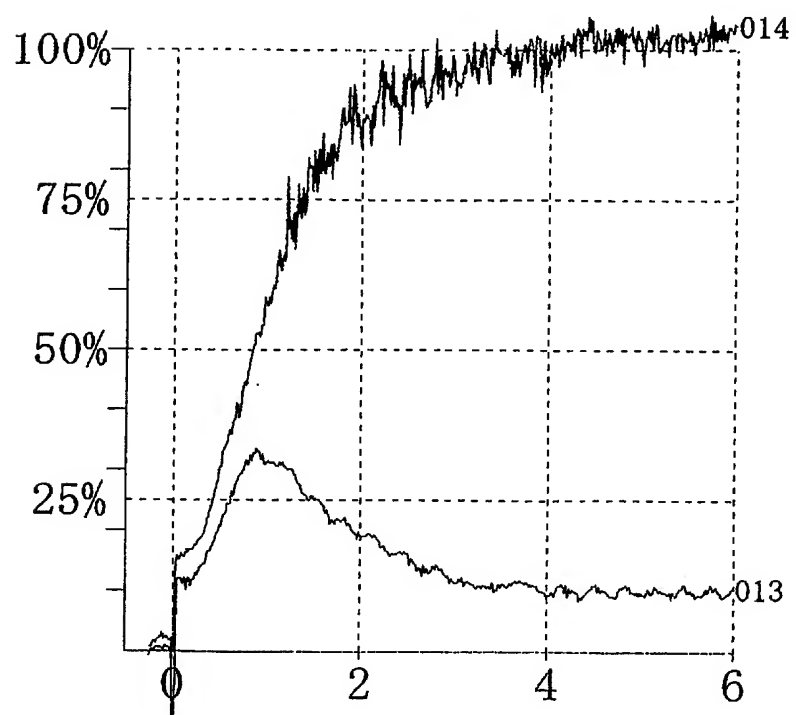
【 図 2 4 】



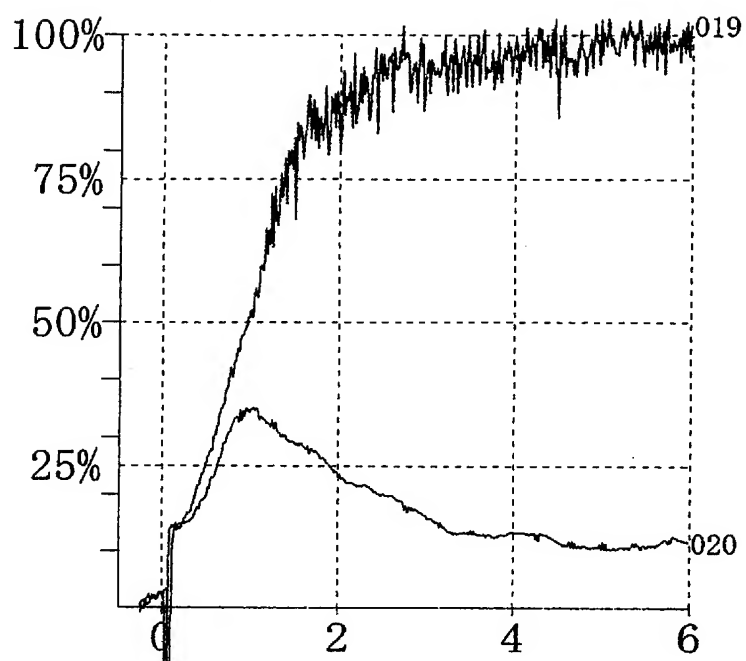
【图 2 5】



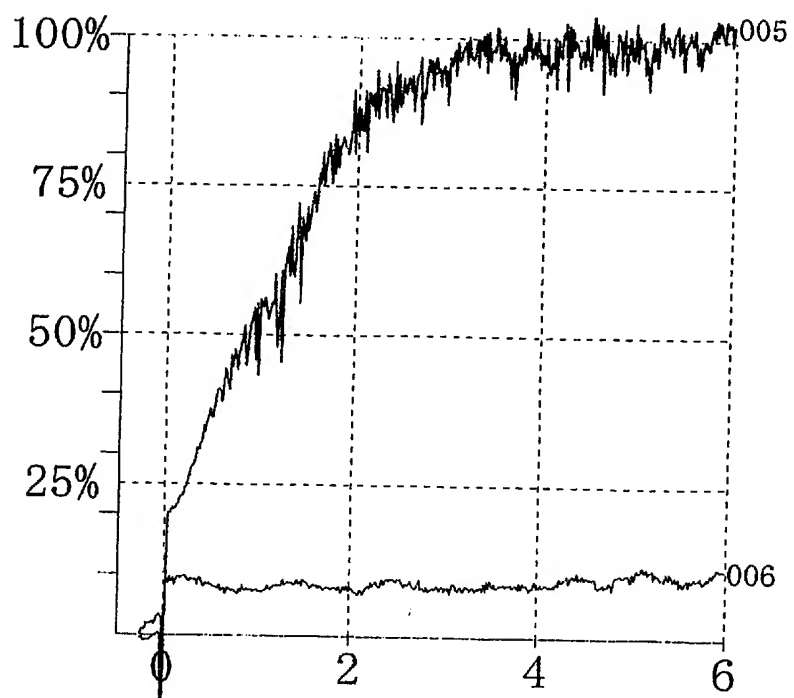
【图 2 6】



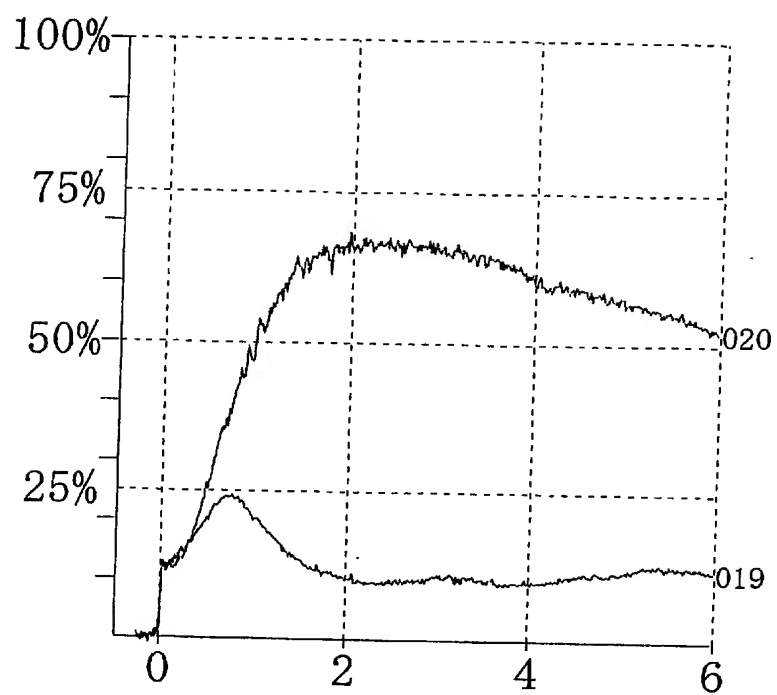
【图 2 7】



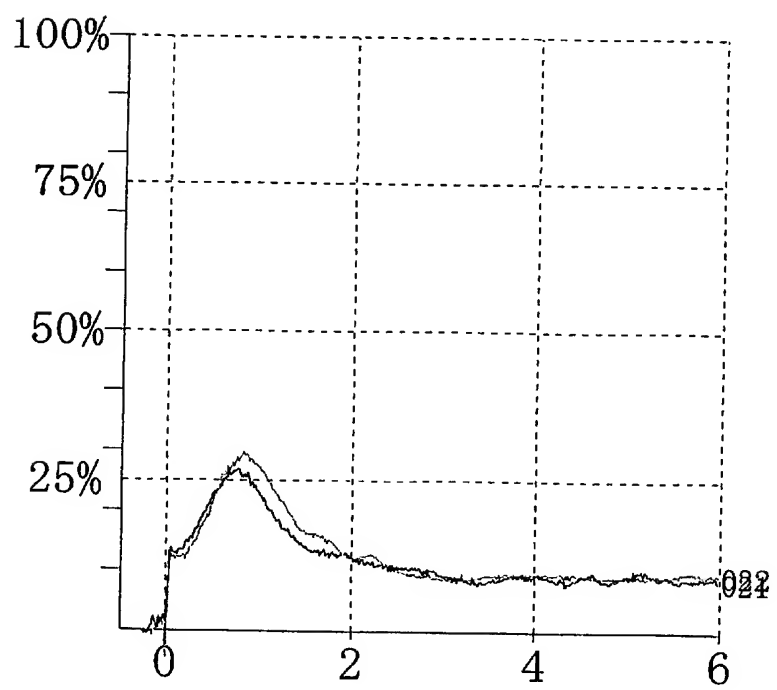
【图 2 8】



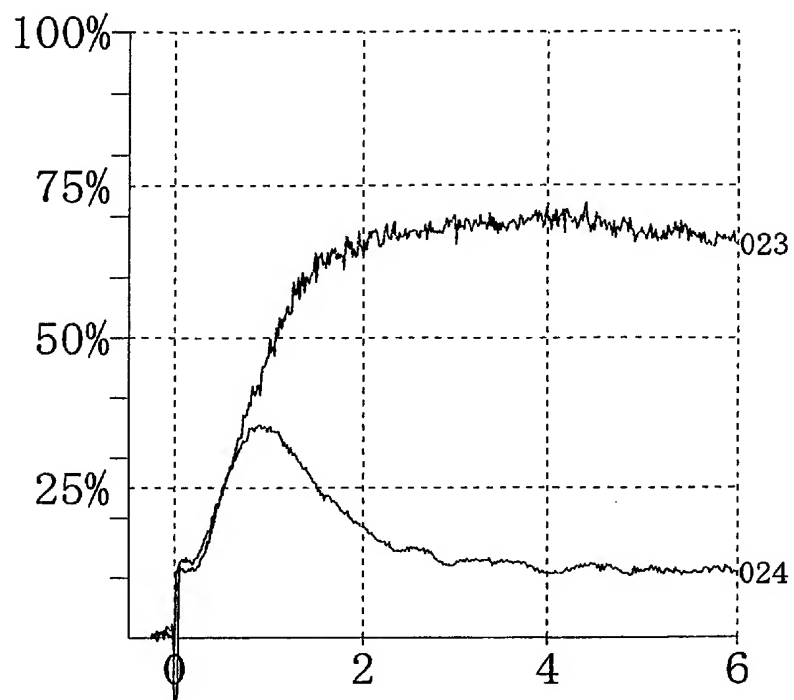
【图 2 9】



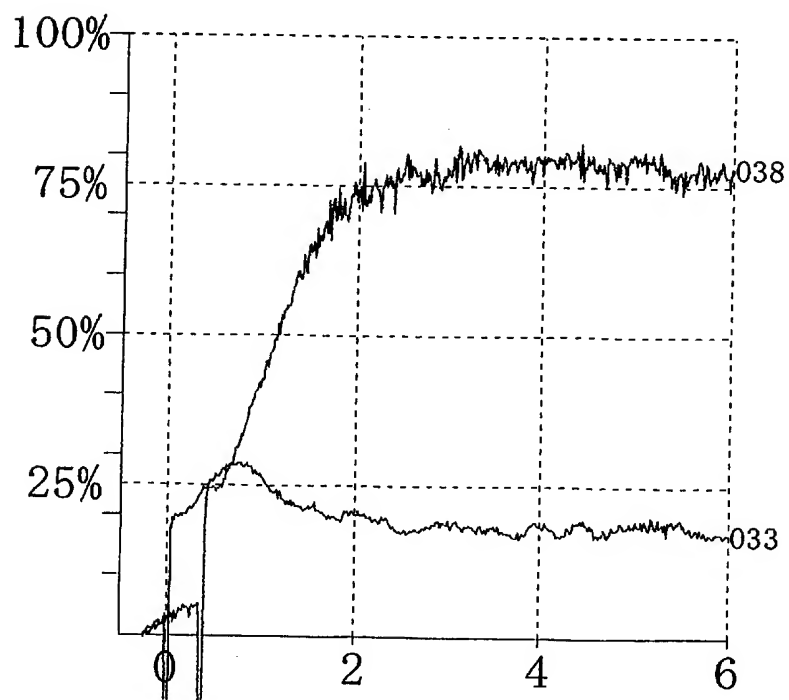
【图 3 0】



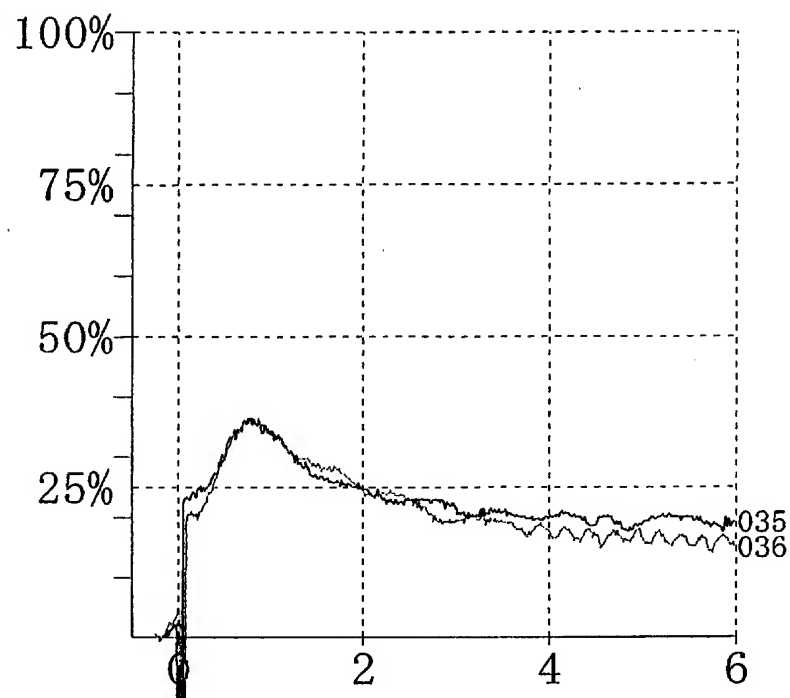
【图 3 1】



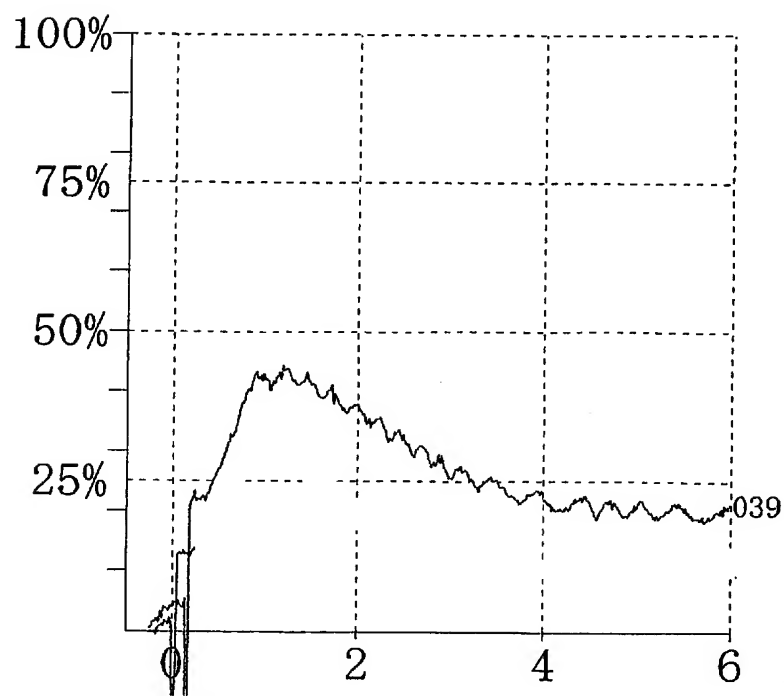
【图 3 2】



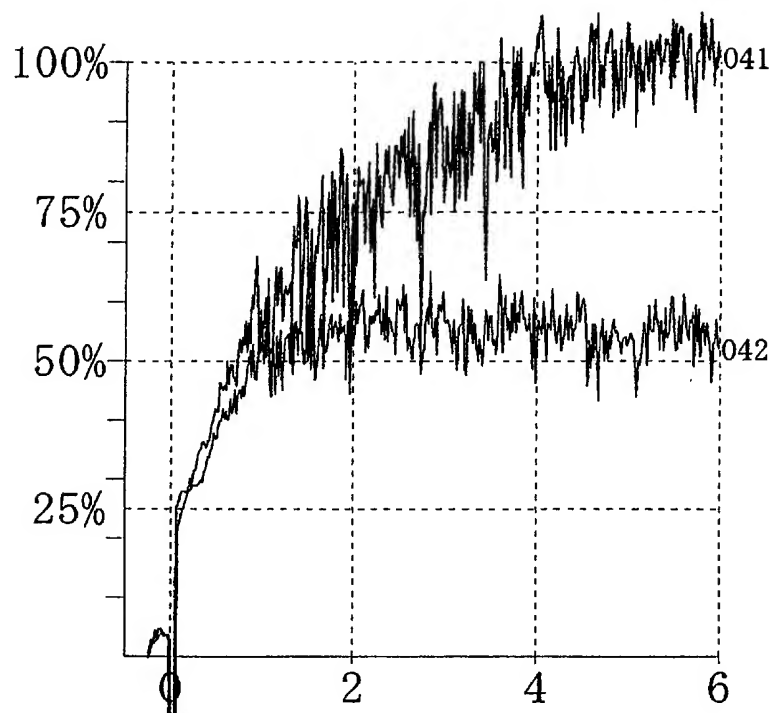
【图 3 3】



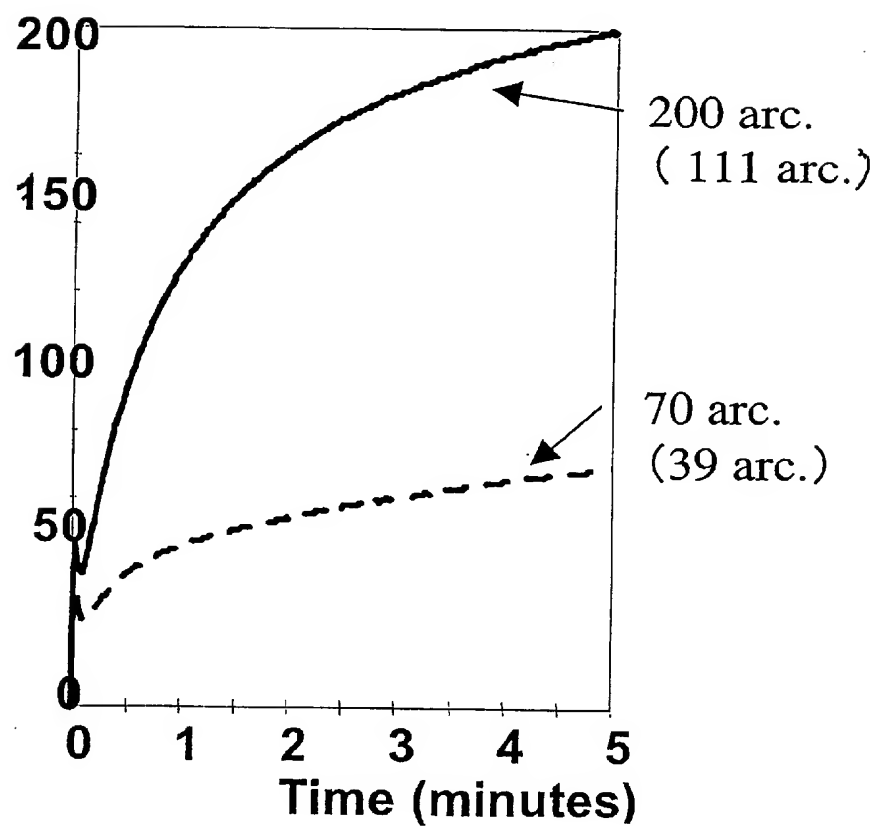
【图 3 4】

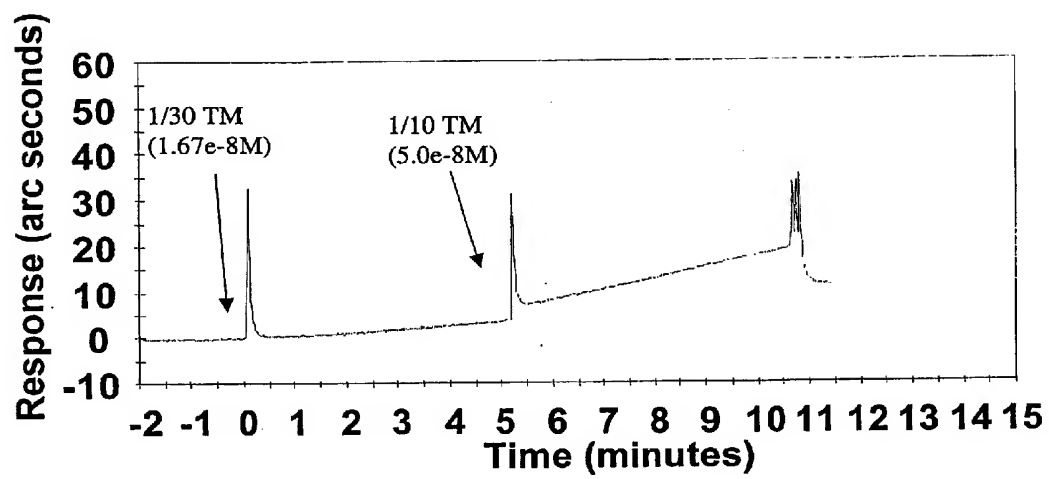


【 図 3 5 】



【 図 3 6 】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗血栓治療薬又は抗炎症治療薬として好適なトロンビン誘導体を提供する。

【解決手段】 トロンビンにアミノ酸置換を導入し、アミノ酸置換トロンビン誘導体の中から基質分解活性が低下し、かつ基質結合能を保持したトロンビン誘導体を選択する。具体的にはB鎖203グリシン及びB鎖205セリン及びB鎖43ヒスチジン及び99アスパラギン酸が置換されたトロンビン誘導体及びそのカルボキシル基修飾体などを選択する。

【選択図】 図1

【書類名】	手続補正書
【整理番号】	P-C50037H1
【提出日】	平成17年 3月 2日
【あて先】	特許庁長官殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2005- 29360
【補正をする者】	
【識別番号】	000002071
【氏名又は名称】	チッソ株式会社
【補正をする者】	
【識別番号】	000224101
【氏名又は名称】	藤森工業株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100100549
【弁理士】	
【氏名又は名称】	川口 嘉之
【発送番号】	016485
【手続補正1】	
【補正対象書類名】	特許願
【補正対象項目名】	代理権を証明する書面
【補正方法】	追加
【補正の内容】	
【提出物件の目録】	
【物件名】	委任状 1

【添付書類】

委任状



平成17年2月1日

私は、

識別番号 100100549 弁理士 川 口 嘉 之 氏

識別番号 100090516 弁理士 松 倉 秀 実 氏

識別番号 100089244 弁理士 遠 山 勉 氏

を以て、代理人として下記事項を委任します。

記



1. 特許願

に関する手続

- 特願 2004-80950 特願 2004-170346
特願 2004-217834 特願 2004-31563/
1. 上記出願又は
に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先
権の主張及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権及び意匠権に基づく権利及びこれらに関
する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は実用新案登録に対する登
録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録及び意匠登録に対する無
効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正審判の請求
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所（居所）

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号

氏名（名称）

藤森工業株式会社
代表取締役社長 藤森明彦

（代 表 者）



出願人履歴

0 0 0 0 0 2 0 7 1

19900823

新規登録

大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号

チッソ株式会社

0 0 0 2 2 4 1 0 1

19900830

新規登録

5 9 7 0 7 2 3 4 9

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号

藤森工業株式会社